

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARIA ISABEL SILVA

**DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA A SINTASE
NEURONAL DO ÓXIDO NÍTRICO (nNOS) NO HIPOCAMPO DE POMBOS
(*Columba lívia*) APÓS APRENDIZAGEM DE ESCOLHA ALIMENTAR.**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas, como requisito parcial
para a obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Co-orientador: Prof^º Dr^º Cláudio Antônio Barbosa de Toledo

Campinas – SP

2007

UNIDADE	BC
Nº CHA- (DA)	
UNICAMP	
Si38d	
V	Ex
TOMBO BCOL	73277
PROC	16145-07
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	4,00
DATA	11/07/07
BIB-ID	415539

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Si38d

Silva, Maria Isabel

Distribuição de células imunorreativas para a sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS) no hipocampo de pombos (*Columba lívia*) após aprendizagem de escolha alimentar / Maria Isabel Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Cláudio Antônio Barbosa de Toledo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Óxido nítrico sintase. 2. Hipocampo (Cérebro). 3. Aprendizagem espacial. I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes. II. Toledo, Cláudio Antônio Barbosa de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Distribution of neuronal nitric oxide synthase immunoreactive cells for neural in the hippocampus of pigeon after food-choice learning.

Palavras-chave em inglês: Nitric-oxide synthase; Hippocampus (Brain); Spatial learning.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Francesco Langone, Simone Aparecida Teixeira.

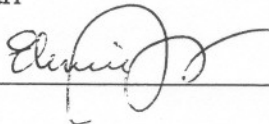
Data da defesa: 28/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

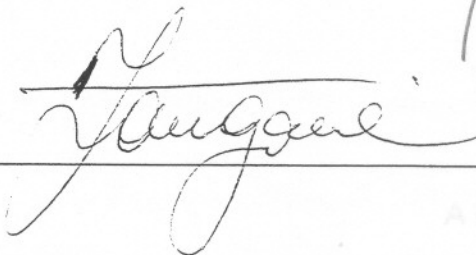
Data da Defesa: 28/02/07

Banca Examinadora

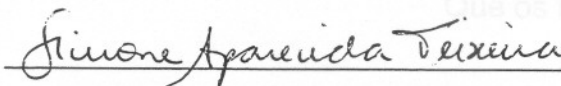
Profª Drª Elenice Aparecida de Moraes Ferrari



Profº Drº Francesco Langone



Profª Drª Simone Aparecida Teixeira



Profª Drª Elisângela Farias Silva

Profº Drº Fábio Rogério

200729594

“... A vida
É luta renhida;
Viver é lutar
A luta é combate
Que os fracos abate
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar”
(Gonçalves Dias)

À DEUS que capacitou minhas mãos e foi o amigo fiel de todos
os momentos desta conquista.
À minha mãe Maria Terezinha e minha avó, Maria Cunha. Mulheres
fortes que me ensinaram tudo o que sou.

Ao meu pai, madrasta e irmãos que percorrem comigo esta estrada
chamada vida.

Dedico

Agradecimentos

“Para serdes vencedores na batalha da vida terrena, conta sempre com o auxílio dos companheiros...”. (Bezerra de Menezes)

À Profª Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari pelos cuidados dispensados à minha formação.

Ao Prof. Dr. Cláudio Antônio de Toledo pela co-orientação e exemplo.

Ao Prof Dr. Francesco Langone por fornecer condições de análise quantitativa do material.

Aos Funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pela rotina amigável.

Aos colegas de pós-graduação integrantes do laboratório do Prof. Dr. Langone: Alexandre, Fabio, André, Débora, Fernanda Pelagio, César, Cristiane, Gustavo e Fernanda Hussein.

A todos do Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento: Washington, Luís Fernando, Maria Luiza, Elaine, Magda, Peterson e Sabrina pelos ensinamentos técnicos, as conversas, o companheirismo e discussões as quais me fizeram crescer.

Aos amigos do laboratório de Neurociências da UNICID, em especial, a Rosinha que muito contribuiu para realização desse trabalho.

Aos amigos Luís Siqueira, Fernando Canova e Alexandre Rezende pelo apoio em todos os momentos.

À minha mãe que, mesmo ausente fisicamente, continua sendo a luz para meus passos.

À minha avó, meu exemplo de força e coragem que permeia minhas gostosas lembranças. Nosso amor ultrapassa a esfera material.

Ao meu pai José Fernandes que sempre me inspirou dignidade e força.

À minha “boadrasta” Dora, por ser o anjo bom das nossas vidas.

Aos meus irmãos Marta, Edmundo e Rosa que mimaram a irmã caçula e proporcionaram a formação dos valores culturais e o amor à docência.

Aos meus jovens sobrinhos, Mariana, Tiago, Danilo, Manoela, Sara, Rafael e Laura... Que saibam perpetuar a força de nossa família.

À “mineirada” que, mesmo à distância, torcem por mim: meus cunhados, Cléber, Roque e Marta, a querida Tia Wanda, Viviane, Lucas, Daniel, Yasmin, Tia Edna, Tio Uedson, Cicília, Júnio e Gabriel.

Ao “mano do coração” Rogério... Os verdadeiros amigos são os irmãos que escolhemos...

À Marcela, Valéria, Neife, Cíntia que me distraiam nos momentos de estresse, consolaram minhas perdas e se regozijaram nas minhas alegrias. Meu muito obrigado.

Aos amigos Heleni, Rosana, Priscila, Patrícia e Alexandre Rossetti pelo convívio nos primeiros passos fora de casa.

Aos animais que em prol da ciência foram sacrificados.

A CAPES pela concessão da bolsa do mestrado.

Lista de tabelas e figuras

Fig 1- Representação esquemática do equipamento e situação experimental

Fig 2 Esquema de cortes frontais de encéfalos de pombos nos níveis A5.75, A66.75 e A8.00 (Karten e Hodos, 1967).

Fig.3 Latência média da resposta de escolha em função das tentativas ao longo da Sessão I do treino

Fig 4 Latência média da resposta de escolha em função das tentativas ao longo das Sessões

Fig 5 Latência média da resposta de escolha ao longo das Sessões do treino, para o EXP5

Fig 6 Índice de resposta de escolhas corretas em função das Sessões I, II, III, IV e V do treino para EXP5

Fig Número médio de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos para os grupos.

Fig 8 Número médio de células nNOS-positivas nas regiões dorsal (HpD) e ventral (HpV) do hipocampo de pombos para os grupos

Fig 9 Número médio de células nNOS-positivas nas regiões ventro-lateral (HpVL) e ventro-medial (HpVM) do hipocampo de pombos para os grupos .

Tab1 Número médio (+ erro padrão da média) de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos para os grupos .

Fig Células nNOS positivas considerando-se

10 a marcação nas regiões dorsal para os grupos MAN, CONT1, EXP1

Fig Células nNOS positivas considerando-se a

11 marcação nas regiões dorsal para os grupos CONT5, EXP5

Fig Células nNOS positivas considerando-se

12 a marcação na região ventral para os grupos MAN,CONT1,EXP1

Fig Células nNOS positivas considerando-se

13 a marcação na região ventral para os grupos CONT5,EXP5

Fig Os tipos neuronais marcados considerando-se a marcação na região ventral.

14

Tab 2 **Latência de escolha nas tentativas, nas Sessões 1, 2 e 3 de treino dos animais do grupo treinado cinco dias (EXP5)**

Tab 3	Latência nas tentativas para nas Sessões 4 e 5 de treino dos animais Experimental 5 dias
Tab 4	Latência nas seis tentativas para a única sessão de treino do grupo Experimental 1 dia (Exp1)
Tab 5	Latências comparadas nas seis tentativas da primeira sessão de treino do grupo Experimental 1 dia
Tab 6	Contagem geral para células nNOS+ para Hipocampo Dorsal (HpD), Ventro-Lateral (HpVL), Ventro-Medial (HpVM) para os grupos Manipulação (Man), Controle1 dia (Cont1), Experimental 1 dia (Exp1), Controle 5 dias (CONT5) e Experimental 5 dias (Exp5)
Tab 7	Contagem geral para células nNOS+ para Hipocampo Dorsal (HpD) para os grupos Manipulação (Man), Controle1 dia (Cont1), Experimental 1 dia (Exp1), Controle 5 dias (CONT5) e Experimental 5 dias (Exp5)
Tab 8	Contagem geral para células nNOS+ para Hipocampo Ventral para os grupos Manipulação (Man), Controle1 dia (Cont1), Experimental 1 dia, (Exp1), Controle 5 dias (CONT5) e Experimental 5 dias (Exp5)
Tab 9	Contagem para células nNOS+ para Hipocampo Ventro-Lateral (HpVL), Ventro-Medial (HpVM) para os grupos Manipulação (Man), Controle1 dia (Cont1), Experimental 1 dia (Exp1), Controle 5 dias (CONT5) e Experimental 5 dias (Exp5)
Tab 10	Contagem para células nNOS+ para Hipocampo Dorsal (HpD), Ventral (HpV) para os grupos Manipulação (Man), Controle1 dia (Cont1), Experimental 1 dia (Exp1), Controle 5 dias (CONT5) e Experimental 5 dias (Exp5)

Lista de abreviaturas

ANOVA	Análise de variância
AVP	Arginina vasopressina
CA1	Área Corno de Amon 1
CA3	Área Corno de Amon 3
CONT1	Grupo de Animais controle treinados 1 dia
CONT5	Grupo de Animais controle treinados 5 dias
CB	Calbindina
CR	Calretinina
DMd	Área Dorso-medial-dorsal
DMv	Área Dorso-medial-ventral
eNOS	Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase
EXP1	Grupo de Animais Experimental treinados 1 dia
EXP5	Grupo de Animais Experimental treinados 5 dias
Glu	Glutamato
Hp	Hipocampo
HpD	Hipocampo Dorsal
HpV	Hipocampo Ventral
HpVM	Hipocampo Ventro-medial
HpVL	Hipocampo Ventro-lateral
iNOS	Isoforma induzível da sintase do óxido nítrico
LA	Labirinto aquático
L-NAME-	N-nitro-L-arginina metil éster
L-NIO	Aminoguanidina

7-NI	7-nitroindazole
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
nNOS	Isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico
NMDA	N-metil-D-aspartato
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
1. Introdução	01
1.1. Aprendizagem espacial	02
1.2. Bases neuroanatômicas da aprendizagem e memória espacial: O papel do Hipocampo	05
1.3. O hipocampo e a formação hipocampal	08
1.4. O sistema hipocampal de aves	09
1.5. Papel dos processos sinápticos mediados por Glutamato e Óxido Nítrico na Aprendizagem e Memória	12
2. Objetivos	18
3. Material e Métodos	19
3.1. Animais	19
3.2. Equipamento	19
3.4. Procedimentos	21
3.4.1. Coleta de Amostras	22
3.4.2. Processamento Imunoistoquímico	24
3.5. Análise da marcação de células nNOS-positivas	25
3.6. Análise Estatística	27
4. Resultados	28
4.1. Análise da Aprendizagem e Memória Espacial	28
4.2. Análise do número de células nNOS-positivas	32
5. Discussão	47
6. Conclusões	56
7. Referências Bibliográficas	57
Anexos	71

RESUMO

O hipocampo exerce papel fundamental no processamento de aprendizagem e memória espaciais. Comparações das características funcionais, anatômicas e neuroquímicas do hipocampo são favorecidas por evidências oriundas de estudos sobre aprendizagem espacial em mamíferos e aves. O objetivo do presente estudo foi analisar a marcação imunohistoquímica de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos (*C.livia*) após diferentes durações do treino em aprendizagem espacial. Foram analisados grupos de animais não treinados (MAN), treinados em 1 sessão (EXP1), treinados em 5 sessões (EXP5), expostos à arena em 1 sessão (CONT1) ou em 5 sessões (CONT5). As sessões foram realizadas numa arena onde havia quatro comedouros, um dos quais com alimento. Em cada sessão, com seis tentativas, registrou-se a latência (seg) e a assertividade da escolha de um comedouro. Após os testes comportamentais, usou-se imunoistoquímica para a análise da marcação de células nNOS-positivas no hipocampo dorsal e ventral. O grupo EXP5 teve diminuição da latência de escolha ($F_{4, 28}=23,74$; $p<0,001$) e aumento das respostas corretas ($F_{4, 35}=8,66$; $p<0,001$) em função do treino. A marcação das células nNOS-positivas no hipocampo foi significativamente maior no hipocampo dorsal dos animais EXP5 em comparação com o hipocampo ventral ($F_{4,22}=104,79$; $p<0,001$) e com os demais grupos ($F_{4,22}=10,17$; $p<0,001$). O aumento da imunorreatividade de células nNOS-positivas no hipocampo dorsal de pombos após a aprendizagem da localização do comedouro correto sugere o envolvimento desta região e de processos mediados por transmissão glutamatérgica nesse processo de aprendizagem e memória em pombos.

ABSTRACT

The hippocampus has fundamental role in spatial learning and memory processes. Functional and neurochemical analysis of the hippocampus are favored by evidence on spatial learning in mammals and birds. The present study examined the immunohistochemical expression of nNOS- positive cells in the hippocampus of pigeons (*C.livia*) after training in food location task. Animals were trained in one (EXP1) or five (EXP5) sessions or had one (CONT1) or five sessions (CONT5) of exposure to the experimental arena. The six trials sessions were conducted daily in one arena with 4 food bowls, one of which had food. Latency and accuracy of choice were recorded. After behavioral tests, nNOS immunoreactivity in hippocampal cells was analyzed. EXP5 showed reduction in latency of choice ($F_{4,28}=23,74$; $p<0,001$) and increases in correct choice ($F_{4, 35}=8,66$; $p<0,001$) as function of the training. The expression of nNOS- positive cells was significantly higher in the dorsal hippocampus of EXP5 group as compared with the ventral hippocampus ($F_{4,22}=104,79$; $p<0,001$) and the other groups ($F_{4,22}=10,17$; $p<0,001$). The increases of nNOS-immunoreactive neurons after learning of the food location suggest that nNOS is involved in processes of spatial learning and memory that are mediated by the dorsal hippocampus of pigeons

1. Introdução

O processo de aprendizagem envolve modificações no comportamento e no sistema nervoso que ocorrem em função da interação do organismo com os eventos do ambiente externo e interno. Essa interação pode resultar da experiência direta do organismo com estímulos do ambiente ou, indiretamente, quando o organismo observa o próprio desempenho ou o desempenho de outros organismos numa determinada situação (KANDEL *et al.*, 2000).

No nível comportamental, as mudanças envolvem a aquisição de um novo comportamento ou a reorganização de respostas em situações complexas (SKINNER, 2000). Estas alterações são consideradas aprendidas quando são mantidas ao longo de períodos de tempo que variam de segundos, horas ou até anos. As experiências do organismo alteram também o sistema nervoso, na forma, na estrutura e na função de células neurais, de sinapses e de circuitos neuronais (MORRIS, 1988, CARLSON, 2001, KANDEL *et al.*, 2000).

A permanência da aprendizagem no tempo é relacionada diretamente ao processo de memória, caracterizada pela codificação e armazenamento das informações adquiridas por meio das experiências no sistema nervoso central (SNC). Dessa forma, memória refere-se aos processos e mecanismos de codificação, consolidação, retenção e evocação das informações aprendidas que ocorrem no sistema nervoso central (BEAR *et al.*, 2002; XAVIER, 1993).

Tanto a aprendizagem quanto a memória têm valor adaptativo, como é indicado pelo fato de que tais processos resultam no desenvolvimento de comportamentos adequados às mudanças constantes no ambiente, permitindo previsibilidade e reações rápidas que são favoráveis ao bem estar e à sobrevivência do organismo (SHERRY *et*

al., 1992). Os comportamentos que não têm conseqüências ou têm conseqüências negativas têm menor probabilidade de se repetirem.

A memória pode ser classificada com base no período de tempo de seu armazenamento (LENT, 2003). Dessa forma, existe a memória de curto prazo ou de curta duração, que se refere ao armazenamento de pequena quantidade de informações por período de tempo limitado a segundos ou poucos minutos. A memória de longo prazo ou de longa duração refere-se ao armazenamento de grande quantidade de informações por um período de tempo longo, que pode variar em horas, dias e até anos (GRAFMAN, 2000; EICHENBAUM, 2001; IZQUIERDO *et al.*, 1999; IZQUIERDO *et al.*, 2000).

A memória também é classificada com base no conteúdo ou no tipo de informação que é armazenada. Por exemplo, a informações sobre fatos ou eventos são armazenadas em um tipo de memória que é denominada declarativa ou explícita, cuja evocação requer um esforço consciente. Já as informações relacionadas com comportamentos que se repetem com muita frequência (hábitos), condicionamentos reflexos ou habilidades motoras, são armazenadas no sistema de memória implícita (BEAR *et al.*, 2002; SQUIRE e KANDEL, 2003).

1.1. Aprendizagem espacial

O organismo vive num ambiente que provê um espaço tridimensional com uma diversidade de estímulos físicos, químicos e sociais. Nesse espaço o organismo atua e responde aos estímulos externos e também aos estímulos originários do seu próprio corpo (internos). Assim, é importante que o organismo adquira informações sobre o espaço em que vive. Quando o processo de aprendizagem se relaciona com a aquisição de informações sobre o espaço e os objetos nele dispostos, temos um tipo de aprendizagem que é denominada aprendizagem espacial. Ou seja, numa situação de

aprendizagem espacial o indivíduo tem o seu comportamento controlado por estímulos e informações sobre os eventos que estão presentes ou já estiveram no espaço e, como resultado ocorre a aquisição ou a modificação dos comportamentos de orientação, localização, aproximação ou afastamento em relação a esses eventos (PRIOR e GUNTÜRKUN, 2001; PRIOR, 2002; ROSSIER *et al.*, 2000). Portanto, a memória espacial refere-se aos processos pelos quais as informações sobre o espaço e as respostas adequadas a ele são codificadas, processadas, armazenadas e evocadas.

É interessante notar que nas interações com o espaço tridimensional são adquiridas diferentes informações que podem ser usadas em diferentes padrões ou estratégias comportamentais. Dependendo da situação, uma estratégia pode ser usada exclusivamente ou em combinação com outras. Essas possibilidades são evidenciadas por diferentes experimentos que usam diferentes arranjos espaciais e diferentes tarefas comportamentais (GEORGE *et al.*, 2001; POUZET *et al.*, 2002; FINE e JACOBS, 2002).

Nesse sentido, para melhor compreender as estratégias utilizadas nesse tipo de aprendizagem e memória, o pesquisador Richard Morris, desenvolveu um teste experimental denominado labirinto aquático, normalmente referido como Labirinto Aquático de Morris (MORRIS, 1981; MORRIS *et al.*, 1988). Nesse teste, um tanque com água opaca contendo uma plataforma submersa localiza-se no centro de uma sala, em cujas paredes da sala são fixadas pistas diferenciadas. Os roedores testados são liberados no tanque, a partir de pontos pré-determinados e diferenciados a cada colocação. A tarefa dos animais é localizar a plataforma submersa fixa, emitindo uma resposta de fuga no centro de uma sala experimental. Neste teste, um dos critérios de avaliação da resposta é a medida de latência, ou seja, o intervalo do tempo entre a colocação do roedor na água e a chegada na plataforma. Para que isso ocorra os animais

podem usar as pistas (figuras e/ou objetos) que compõem o espaço da sala experimental para orientar-se e aprender a sua localização (MORRIS, 1981).

Um outro teste experimental usado para a aprendizagem espacial é o Labirinto Radial composto de uma plataforma central que pode ter, normalmente, até oito extensões denominadas braços. A tarefa consiste na resposta de entrada em um dos braços que, ao estar correta, é conseqüenciada com a obtenção de porções de alimento. A aprendizagem pode ser aferida também pelo índice de latência e pelo índice de acertos, isto é, o número de vezes em que a resposta à situação foi assertiva. A entrada num braço já visitado anteriormente é considerada um erro (OLTON *et al.*, 1978; BOND *et al.*, 1981).

Nessas situações, de acordo com a teoria do mapeamento cognitivo, a memória espacial pode envolver a formação de um mapa representativo do espaço. No sistema de mapeamento cognitivo ocorre a utilização de informações presentes no espaço (lugar) para a formação de um mapa que pode ser definido como uma representação neural do ambiente externo, construído a partir de experiência prévia e da determinação de distâncias, direção e posição espacial de locais e estímulos (SPETCH e HONIG, 1988; WHISHAW, 1998; MORRIS, 1981). De fato, os elementos da situação podem ser processados em dois diferentes sistemas hipocampais: sistema de taxon e o sistema de mapeamento cognitivo (O'KEEFE e NADEL, 1976 e 1978; MORRIS, 1981; MORRIS *et al.*, 1988). O processamento das informações pelo sistema de taxon permite a utilização de duas diferentes estratégias para a solução de uma tarefa: a de orientação e a de guiamento. A primeira, também chamada de estratégia de resposta egocêntrica, estabelece a localização espacial de pontos (denominados alvo, em determinadas tarefas) utilizando estímulos proprioceptivos, independente da distribuição das pistas sensoriais intra ou extra-espacial, podendo relacionar o processo de aprendizagem à

repetição de seqüências de movimentos realizados. Por outro, a estratégia de guiamento considera a localização mediante a utilização de seqüência de pistas sensoriais locais ou estímulos sinalizadores.

1.2. Bases neuroanatômicas da aprendizagem e memória espacial: O papel do Hipocampo

O exemplo clássico de estudos da organização anatômica da memória é, sem dúvida, o do paciente H.M., estudado pela psicóloga canadense Brenda Milner. Tal caso se destacou já que depois de uma cirurgia de ressecção bilateral do lobo temporal medial, H.M. apresentava dificuldade na aprendizagem, no armazenamento de novas informações, sendo incapaz de evocá-las para o desempenho de uma tarefa imediatamente após o término da mesma, caracterizando amnésia anterógrada (SQUIRE e KANDEL, 2003). Com o caso H.M., verificou-se a importância de intensificar os estudos sobre as funções do lobo temporal medial bem como de estruturas interconectadas, como hipocampo (Hp), córtex entorrinal, córtex perirrinal e córtex para-hipocampal.

Na década de 70, John O'Keefe e colaboradores deram início a uma série de experimentos que resultaram no conhecimento de que muitos neurônios no hipocampo respondem seletivamente a localização do organismo no espaço. Alguns neurônios aumentam seus disparos apenas quando o animal se encontra em locais específicos. Esta célula que aumenta a atividade em determinados locais denomina-se célula de lugar. (BEAR, 2002; CARLSON, 2001, SQUIRE e KANDEL, 2003). A existência dessas células de lugar associadas, ou não, ao mapeamento cognitivo e a campos receptivos que consideram estímulos e eventos familiarizados, indica um dos aspectos da complexidade das bases neurais da aprendizagem espacial e memória.

Os estudos experimentais do hipocampo tiveram grande importância para o conhecimento da organização neural da aprendizagem e memória. Atualmente, sabe-se que além do hipocampo participar da organização de comportamentos envolvidos com a orientação espacial, tem função no armazenamento temporário das informações adquiridas recentemente antes que estas sejam distribuídas e armazenadas em outras regiões encefálicas (EICHENBAUM, 1992; IZQUIERDO *et al.*, 2000; COLOMBO e BROADBENT, 2001; POUZET *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 2002).

Em seu conjunto, a literatura sobre o papel do hipocampo na aprendizagem e memória espacial indica que o sistema hipocampal de aves, mamíferos, primatas e humanos participa nesses processos comportamentais e cognitivos (MISHKIN, 1978, AGGLETON, *et al.*, 1986, CAVE e SQUIRE, 1991, COLOMBO *et al.*, 1997). O hipocampo e as estruturas relacionadas, referentes à formação hipocampal, tem função de regulação neural dos processos relacionados à memória, principalmente, os que envolvem aprendizagem espacial (AMARAL-TOMA e FERRARI, 2004).

Tal como em mamíferos, estudos envolvendo testes de escolha alimentar avaliaram a aprendizagem espacial de pombos após lesões no hipocampo. Verificaram prejuízos na navegação ou mapeamento espacial, com aumento de latência, menor índice de acertos de escolhas ao longo do treino e em testes de reversão (SPETCH e HONIG, 1988; DUSEK e EICHENBAUM, 1997; BINGMAN *et al.*, 1989; COLOMBO e BROADBENT, 2000; ROSSIER *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 2002).

Dentre os estudos de aprendizagem espacial, Watanabe (2001) utilizou modelo experimental de lesões hipocampais em pombos e verificou prejuízo da aquisição de discriminação espacial após lesão, em relação aos animais do grupo controle. Watanabe e Bischof (2004) verificaram a função do hipocampo na memória espacial de pássaros *zebra finches*, utilizando como tarefa a identificação de alimento localizado

corretamente em apenas um de quatro comedouros da arena experimental. Para tanto, o animal também poderia utilizar as pistas localizadas externamente à caixa experimental.

Relacionando aprendizagem espacial e lesões hipocampais, Amaral-Toma (2003) utilizou um aparato experimental constituído de pistas visuais fixadas nas paredes e, no centro da sala, localizava-se uma arena circular, virtualmente dividida em quatro quadrantes. Em cada um dos quadrantes foi colocado um comedouro, sendo que apenas um era preenchido com alimento. As sessões de treino tinham seis tentativas e, em cada uma delas, o animal era liberado de pontos opostos ao comedouro correto, tendo como critério de avaliação, os valores de latência e os índices de escolha corretas. Neste contexto experimental, foram avaliados os efeitos de lesões hipocampais em pombos, verificando-se aumento da latência de escolha na primeira sessão pós-operatória dos animais experimentais. Esses resultados indicam que as lesões hipocampais prejudicaram o desempenho neste tipo de aprendizagem e sugere que os animais experimentais utilizaram um mapa espacial, como ocorre nos mamíferos.

Mais recentemente, Watanabe (2006), utilizando o mesmo modelo experimental de lesão com ácido ibotênico para pombos, teve como objetivo estudar os efeitos da lesão na discriminação espacial. Para tanto, os animais passavam por treinamento pré-operatório em uma tarefa de respostas entre três discos sendo que, apenas um era considerado correto. Após 15 dias de treino, os animais foram submetidos a lesões do hipocampo medial ou lateral. Nos testes pós-operatórios, os animais lesados apresentaram, em relação aos animais controle, prejuízo de aprendizagem. O segundo experimento do estudo submeteu os animais aos mesmos procedimentos experimentais de discriminação espacial e após o pré-teste, os pombos foram submetidos a uma cirurgia cujo objetivo era separar as comunicações entre hipocampo medial e lateral, os resultados sugeriram que a discriminação espacial pode ocorrer relacionando

hipocampo medial e lateral separadamente já que os animais, na sessão pós-cirúrgica, não apresentaram déficit na tarefa.

1.3. O hipocampo e a formação hipocampal

Descrita anatomicamente por Ramon Y Cajal em 1911, a Formação Hipocampal é uma estrutura prosencefálica do lobo temporal que, em mamíferos, inclui o Hipocampo propriamente dito (corno de Ammon), o Giro Denteado e o Subículo. O Hipocampo dos mamíferos é formado pelo arquicórtex, com três camadas celulares paralelas ao Giro Denteado. Anatomicamente, o hipocampo pode ser dividido em quatro campos: a região CA1 ocupa a maior parte da região superior e a CA3 se estabelece na maior porção da região inferior, enquanto que CA2 é uma pequena zona de transição entre CA1 e CA3. Já a região CA4, fica na zona de transição entre o Hipocampo e o Giro Denteado (BEAR *et al.*, 2002; CARLSON, 2001; KANDEL *et al.*, 2000). As regiões CA2 e CA3 são formadas por uma classe de grandes neurônios piramidais e no Giro Denteado encontram-se as células granulares. Esta estrutura recebe estimulação do córtex entorrinal que é parte do sistema límbico e constitui a principal origem de aferência à formação hipocampal. O Subículo (do latim, *Subiculum*) é uma estreita faixa de tecido cortical situado entre o hipocampo e o córtex entorrinal, no giro parahipocampal. O subículo tem função essencial à transmissão de informação da formação hipocampal (KANDEL *et al.*, 2000).

As estruturas constituintes do sistema hipocampal estão interligadas por um circuito excitatório unidirecional, com três vias principais: a via perfurante (emite fibras do córtex entorrinal às células granulares do giro denteado), a via das fibras musgosas (se estende das células granulares do giro denteado às células piramidais da região CA3 do hipocampo) e a via das fibras colaterais de Schaffer que emitem neurônios da região

CA3 a CA1 (KANDEL *et al.*, 2000; CARLSON, 2001). Por isso, esse circuito é referido como circuito tri-sináptico do hipocampo.

1.4. O sistema hipocampal de aves

KARTEN E HODOS (1967) propuseram a divisão do sistema hipocampal em duas grandes áreas: o Hipocampo (Hp) e a área Parahipocampal. Campbell e Hodos (1970), utilizando técnica de Nissl, destacaram padrões celulares distintos que contribuíram para demarcar, anatomicamente, a porção dorsomedial do cérebro anterior em duas grandes áreas: Parahipocampal (APH) localizada dorsolateralmente e o Hipocampo (HP) situado ventromedialmente.

Embora a divisão anatômica do hipocampo de mamíferos seja precisamente estabelecida, a questão relativa à divisão anatômica do hipocampo de aves em diferentes regiões gerou muitas discussões em diferentes estudos. A formação hipocampal de aves é considerada homóloga à de mamíferos com base em critérios topográficos, embriológicos e funcionais. Contudo, a organização morfológica do Hp de aves é muito diferente daquela descrita em mamíferos. Vários estudos que usaram ferramentas imunoistoquímicas investigaram a distribuição de populações neuronais com diferentes características neuroquímicas no Hp de pombos.

Székely (1999) identificou populações de neurônios marcados para calbindina (CB) nas regiões dorsolateral (HpDL), dorsomedial (HpDM) e ventral (HpV). Nessas áreas, identificou existem projeções eferentes para outras regiões: (a) do HpDL, comparável ao subiculum de mamíferos, projetam-se fibras para os núcleos basorostral, arcopálpio, septo lateral e regiões meso-diencefálicas; da área em “V”, comparável ao corno de Amon, originam-se comissuras que se projetam para o Hp contralateral; o HpDM tem conexões intrínsecas comparáveis às do giro denteado. Também relata

Székely (1999) relata a distribuição de neurônios NOS-positivos nas três regiões hipocampais.

Krebs *et al* (1991) analisaram por meio de imunoistoquímica a distribuição de neurotransmissores e suas enzimas correlacionadas na região dorsomedial do hipocampo. Identificaram a presença de colina-acetiltransferase (ChAT), serotonina (*serotonin-like*) (5HT) e tirosina hidroxilase (TH) ao longo de fibras septo-hipocampais e na porção medial da região hipocampal, com marcação mais intensa na região dorsomedial. Células com marcação positiva para a enzima ácido glutâmico decarboxilase (GAD) foram encontradas com distribuição esparsa em toda região dorsomedial.

Erichsen *et al.* (1991), estudaram, no hipocampo de pombos, a distribuição de neuropeptídeos substância P (SP), leucina encefalina (LENK) polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP), colescistoquinina (CCK) e neuropeptídeo Y (NPY) por meio de imunoistoquímica. Evidenciaram, seguindo a descrição regional do Hp proposta por Krebs *et al.* (1991), imunorreatividade para os peptídeos analisados na região do tracto de fibras mediais. Na área em V, encontraram células piramidais com marcação CCK-positivas. Na região dorsal do hipocampo, foram encontradas células Chat, 5-HT, SP e VIP-positivas e a presença de células VIP-positivas delimitou a região dorsomedial-superior.

Um outro trabalho que analisou características celulares, bioquímicas e circuitos neurais do hipocampo de pombos foi realizado por Rosinha (2003), focalizando a marcação de subunidades de receptores de glutamato do tipo AMPA. As subunidades GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 na formação hipocampal de pombos distribuem-se em populações neuronais na área das fibras mediais, na área em forma de V, na área do hipocampo medial, na área dorsomedial e na área do hipocampo lateral. A descrição da

distribuição de receptores do tipo AMPA no hipocampo de pombos contribuiu para fortalecer as evidências do envolvimento dos processos de transmissão glutamatérgica no hipocampo das aves.

Suarez *et al.* (2006) analisaram a distribuição da imunomarcção de GABA, calbindina (CB), calretinina (CR) e nNOS na formação hipocampal e hiperpálido durante o desenvolvimento e fase adulta de galinhas. No hipocampo observaram ampla distribuição de células CB-positivas, principalmente, na área dorso-lateral, sugerindo relação com as células encontradas no córtex entorrinal de mamíferos.

Um estudo recente de grande interesse foi relatado por Kahn *et al* (2003). Nele foi investigada a organização de subdivisões do hipocampo de aves utilizando traçadores retrógrados (toxina colérica subunidade B) e anterógrados (amina dextrana biotinilada). Os autores basearam-se nas divisões de áreas hipocampais sugeridas pelos estudos neuroquímicos de Erichsen *et al* (1991), baseadas na distribuição de neuropeptídeos. Os resultados obtidos por Kahn *et al.* (2003) sugeriram a existência de um circuito tri-sináptico no hipocampo de aves, comparável ao existente no hipocampo de mamíferos. Assim, as fibras provenientes de regiões extra-hipocampais estabelecem sinapses no Hp dorsomedial; as células da região DMd apresentam projeções para a região ventral que, por sua vez, projetam-se para a região DMv que é o local de saída de eferências hipocampais. Em detalhes, a circuitaria hipocampal envolve a região dorso-medial (DM), com as suas subdivisões em dorso-medial-dorsal (DMd) e dorso-medial-ventral (DMv) e a região ventral com suas subdivisões em região ventral lateral (VL) e região ventro-medial (VM). A DMd recebe aferências extra-hipocampais e estabelece sinapses com células da região ventro-lateral (VL) e região ventro-medial (VM), ipsilateralmente e com a VM contralateral. A região VM que recebe aferências da DMd ipsilateral e da VM contralateral tem projeções para a região VL ipsilateral e regiões VM e VL

contralaterais. Finalmente, a região VL recebe aferências diretas da DMd e da VM e projeta-se para a região DMv. A região DMv é considerada uma região de saída para a área para-hipocampal.

1.4. Papel de processos sinápticos mediados por Glutamato e Óxido Nítrico na Aprendizagem e Memória

O glutamato (Glu) é o principal neurotransmissor excitatório do encéfalo e da medula espinhal. O glutamato é considerado como um dos primeiros neurotransmissores que aparecem durante a evolução, visto que é encontrado tanto em organismos mais simples quanto em mais complexos (CARLSON, 2001).

As ações do Glu são mediadas por diferentes tipos de receptores ionotrópicos e metabotrópicos. A maior parte das investigações concentra-se na função dos receptores ionotrópicos e mais recentemente observa-se ênfase também nas funções mediadas por receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos de glutamato são identificados como sendo do tipo NMDA (ativado pela substância N-metil-D-aspartato), AMPA (ativado pela substância alfa-amino-3-hidroxi-5-metilixazole-4-ácido propiônico) e Kainato (ativado pelo ácido caínico) (MAYER e ARMSTRONG, 2004; MAYER, 2005). Embora o receptor AMPA seja o mais comumente encontrado (CARLSON, 2001) a literatura destaca o receptor NMDA por ter características especiais e importantes. Ele contém sítios de ligação no receptor e no canal iônico e controla um canal que permite a entrada de íons Na^+ e Ca^{+2} . Contudo, para a abertura do canal faz-se necessário o deslocamento do íon magnésio que fica ligado ao seu sítio e bloqueia o canal, enquanto a membrana está em seu potencial de repouso. Quando a membrana é parcialmente despolarizada o íon magnésio é repelido, desbloqueando o canal e permitindo o influxo de Ca^{+2} e Na^+ . O Ca^{+2} funciona como segundo-mensageiro,

ativando várias enzimas intracelulares. Assim, o receptor NMDA mostra-se atípico, já que é ligante-dependente na medida em que possui sítios de ligação para o glutamato e voltagem-dependente, isto é, estimulável com a alteração eletro-química da membrana (KANDEL *et al.*, 2000).

Uma das ações do Ca^{+2} que flui pelo canal do receptor NMDA decorre da sua associação com a calmodulina formando o complexo Ca^{+2} - calmodulina que, amplia os sinais bioquímicos e ativa enzimas, como as identificadas como Óxido Nítrico Sintases (NOS). Essas enzimas participam da síntese do Óxido Nítrico (NO) numa reação oxidativa do aminoácido L – Arginina, incorporando molécula de oxigênio ao composto intermediário N-hidroxi-L-arginina e finalmente, a L-citrulina e NO. O NO tem função básica e crucial na interação neuronal, na regulação vascular e na resposta imunitária. Os níveis mais elevados de NO são encontrados em neurônios, onde atua como um neurotransmissor de características peculiares. No sistema nervoso autônomo funciona como o principal neurotransmissor não-adrenérgico não-colinérgico. Como um radical livre, o NO tem atividade inerente e pode mediar toxicidade celular por danificar enzimas críticas na função celular e por reagir com o superóxido para formar um oxidante ainda mais potente, o peróxinitrito (BREDT e SNYDER, 1994; CARLSON, 2001; KANDEL *et al.*, 2000; MADDEN, 2002).

Nas sinapses glutamatérgicas, as enzimas NOS são consideradas reguladoras da expressão de mensageiro retrógrado, visto que o NO atua sobre o neurônio pré-sináptico aumentando a liberação do glutamato e conseqüentemente, da resposta pós-sináptica. Sendo um gás, o NO é uma espécie reativa de nitrogênio sendo, relativamente instável, apresenta propriedades que facilitam sua difusão das membranas celulares sem o auxílio de transportadores específicos agindo nos neurônios adjacentes (MAYER e HEMMENS, 1997). Para a análise do seu envolvimento em processos de plasticidade

neural e memória os pesquisadores usam técnicas que envolvem a administração de precursores e/ou derivados do NO e também de inibidores das enzimas NOS (BREDT e SNYDER, 1994)

As enzimas NOS são encontradas em três isoformas: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS) cujos genomas são análogos sugerindo, portanto, gene NOS ancestral comum. Duas dessas enzimas, a nNOS e a eNOS, estão continuamente presentes e são assim denominadas constitutivas. As atividades da nNOS e eNOS são estimuladas por aumento do Ca^{+2} intracelular. O controle agudo da atividade da nNOS é mediado pela regulação alostérica da enzima, por alterações que ocorrem após a tradução do RNAm e por processos extracelulares. Os níveis de nNOS são dinamicamente regulados por mudanças na transcrição gênica e isso permite alterações duradouras nos níveis teciduais do NO. Uma terceira, a iNOS, não está normalmente presente nas células e devem ser induzidas por citocinas, lipossacarídeos ou produtos microbianos. A ativação da iNOS é independente de Ca^{+2} (ALDERTON *et al.*, 2001; BERDEAUX, 1993; BREDT E SNYDER, 1994; SUSSWEIN *et al.*, 2004).

Desse modo, os estudos que analisam os efeitos dos inibidores de NOS são importantes para o entendimento do envolvimento das diferentes isoformas de NOS com os processos de aprendizagem e memória espacial (BEIJAMINI e GUIMARÃES, 2006).

Zou *et al.*, (1998) relataram prejuízo na memória de referência e na memória operacional testadas num labirinto radial onde em todas as tentativas os mesmos quatro braços do labirinto eram abastecidos. A administração de L-NAME prejudicou as duas memórias, enquanto que a administração de 7-NI afetou apenas a memória operacional.

A administração de L-arginina, doador de NO, teve um efeito facilitador apenas nos últimos 10 dentre os 30 dias de treino.

Prendergast *et al.* (1997) relataram que a administração de L-NAME em doses baixas prejudicou a aprendizagem espacial num labirinto aquático com sinalização do local da plataforma, sendo que a L-Arginina reverteu esse efeito.

Alderton *et al.* (2001) relataram que a enzima nNOS tende a ser ativada por reações de fosforilação e, ao contrário, o acréscimo de radicais Fosfato com Serina-847 através de cinases dependentes de Cálcio-calmodulina precedem sua inativação. Essas interações proporcionam variação na enzima quanto aos sítios de ação, ao tempo de inativação e a substrato-dependência. Além disso, pode-se inibir o processo de síntese por meio da utilização de Nitrosil e em até 95% na forma estável do composto NO-Fe²⁺.

Richard e Gibbs (2003) utilizaram o inibidor da NOS L-NAME administrado bilateralmente no lobo paraolfatório (LPO) e hiperpálcio medial com intuito de avaliar os efeitos da inibição da NOS nos hemisférios cerebrais. Após serem submetidas a treino de tentativa única de esquiva inibitória, os pintainhos receberam infusão de L-NAME no hemisfério direito, hemisfério esquerdo ou em ambos. Os animais que receberam a infusão no LPO entre os intervalos de 5 minutos de pré-treino e 40 minutos de pós-treino não apresentaram prejuízo na retenção das informações. Já os animais, que receberam em infusões unilaterais no hiperpálcio unilateralmente, apresentaram prejuízo na retenção e memória ocorridas 40 minutos de pós-treino. Os resultados demonstraram que o tempo de administração foi hemisfério-dependente, principalmente o hemisfério esquerdo sugerindo que a atividade do NO em cada hemisfério do cérebro de galinhas é necessária para a consolidação da memória para essa tarefa.

Plech *et al.* (2003) analisaram o efeito da infusão de L-arginina, intra-cérebro-ventricular cerebral e arginina vasopressina (AVP), na memória em ratos submetidos a

teste de esquiva inibitória. A infusão de L-arginina, em relação a AVP resultou em aumento da latência da esquiva, em comparação aos animais do grupo controle. A administração periférica de 7-nitroindazole (7-NI) não alterou o desempenho.

De La Torre e Aliev (2005) administraram o inibidor de NOS nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), o inibidor da nNOS 7-Ni e o inibidor da eNOS, L-nitro-imino-etil-orнитина (L-NIO) em ratos treinados no labirinto aquático de Morris. Somente os ratos que receberam L-NIO tiveram prejuízo do desempenho no teste espacial sugerindo que o NO vascular, derivado da eNOS, preservaria a função da memória espacial durante a isquemia cerebral.

Em alguns estudos foram utilizados camundongos modificados geneticamente que tinham ausência de expressão da nNOS (knock-out para o gene nNOS) e treinados em labirinto aquático de Morris para aferir a função da enzima nNOS e do óxido nítrico no processo de aprendizagem e memória espacial. Os resultados indicaram prejuízos no desempenho no labirinto aquático nos animais *knock-out*, quando comparados aos controles (KIRCHNER *et al.*, 2004; WEITZDOERFER *et al.*, 2004).

Fornel *et al.* (2006) analisaram a atividade bioquímica da enzima NOS em cerebelo de pombos que foram submetidos a lesões telencefálicas e, 10 dias depois, a três sessões de treino de aprendizagem de habituação da exploração acústica. Os resultados sugeriram que os animais lesados necessitaram do mesmo número de tentativas em cada sessão evidenciando, assim, prejuízo na memória de longa duração. A análise da atividade da NOS indicou aumento da atividade da NOS Ca^{+2} -dependente em animais lesados e treinados e nos controles treinados, evidenciando a participação da NOS cerebelar durante os processos neurais envolvidos na habituação.

Esse conjunto de estudos exemplifica as evidências experimentais que fundamentam a consideração de que a aprendizagem espacial envolve processos

mediados por neurônios que usam o NO como mensageiro neural. O NO produzido no tecido cerebral é essencial para vários processos de aprendizagem em vertebrados e invertebrados. Contudo, não existem evidências que caracterizem precisamente as funções do NO e sobre os mecanismos que controla durante a aprendizagem e formação de memórias.

O presente trabalho, tais como outros já desenvolvidos no nosso laboratório, consideram que estudos são necessários a fim de investigar algumas questões centrais para o entendimento das funções do hipocampo. Dentre essas questões, destaca-se o envolvimento do hipocampo no processamento de diferentes tipos de informações bem como no envolvimento de mecanismos hipocampais mediados por transmissão glutamatérgica em diferentes tipos de aprendizagem e em diferentes espécies de animais.

Com relação à aprendizagem espacial, os estudos do papel do hipocampo são importantes não apenas para investigar questões relativas aos processos celulares e moleculares subjacentes a diferentes aprendizagens, mas também estender essas análise para o hipocampo de aves e contribuir para o conhecimento das bases neurais da memória. Assim, trabalhos anteriores mostraram que lesões hipocampais prejudicam o desempenho e a memória numa situação de aprendizagem de escolha alimentar (AMARAL-TOMA, 2003; AMARAL-TOMA e FERRARI, 2004). Também foi relatado que lesões hipocampais prejudicam a memória do medo condicionado ao contexto e que o treino em condicionamento clássico aversivo induz a expressão do gene *zenk* no hipocampo de pombos (BRITO *et al.*, 2006; SPERANDÉO, 2005)

2. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a área imunorreativa para nNOS em neurônios do hipocampo de pombos após treinamento em aprendizagem de escolha alimentar.

Os objetivos específicos foram:

1. Analisar a aprendizagem de escolha e localização do comedouro correto em pombos treinados numa única sessão ou durante cinco sessões.
2. Analisar a imunorreação para nNOS em neurônios do hipocampo após 1 sessão de treino e após cinco sessões de treino
- 3, Analisar a imunorreação para nNOS em neurônios de diferentes regiões do hipocampo de pombos: HpD, HpVI e HpVM.

3. Material e Métodos

3.1. Animais:

Foram utilizados trinta pombos (*Columba livia*), machos, adultos, peso médio de 380 gramas, obtidos de fornecedor comercial, e mantidos em gaiolas-viveiro individuais, no biotério de aves do DFB-IB da UNICAMP sob ciclo claro-escuro de 12:12 h e temperatura controlada a 25° C. A alimentação consistia numa mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração granulada para pombos, areia e farinha de ostra. Após a chegada ao biotério, os animais passaram por um período de 15 dias para adaptação às novas condições, sendo submetidos à medidas profiláticas. Nesse período a alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*. Os animais foram aleatoriamente atribuídos em 5 grupos: Experimental com 1 dia de Treino (Exp1, n= 07), Experimental com 5 dias de Treino (Exp5, n = 08), Controle com 1 dia de Exposição à arena (Cont1, n = 06), Controle com 5 dias de Exposição à arena (Cont5, n = 05) e grupo Manipulação (Man, n = 06), submetidos à retirada da gaiola-viveiro, transporte ao laboratório, pesagem e recondução ao biotério durante 15 dias. O protocolo experimental utilizado nesse experimento teve aprovação do Comitê de Ética de Experimentação Animal do Instituto de Biologia, UNICAMP (219-1).

3.2. Equipamento:

Foi utilizada uma arena circular com paredes de fórmica branca (110 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade), cujo piso era revestido com papel. Essa arena foi virtualmente dividida em quatro quadrantes iguais que serviram como base para a localização de cada comedouro nesse espaço. Foi colocado um comedouro em cada quadrante da arena, sendo que um deles continha alimento coberto com areia; os outros três comedouros continham apenas areia. Durante todas as sessões do experimento, a posição da arena em relação aos objetos da sala permaneceu a mesma. Nas paredes da

sala experimental (280 x 190 cm) foram fixadas pistas visuais evidentes, figuras geométricas, verde, vermelha, amarela e azul (Figura 1). Uma câmara de vídeo posicionada no teto da sala, a 190 cm acima do centro do labirinto, registrou a trajetória e o comportamento dos animais. O monitor e o gravador de vídeo ficavam localizados numa sala adjacente.

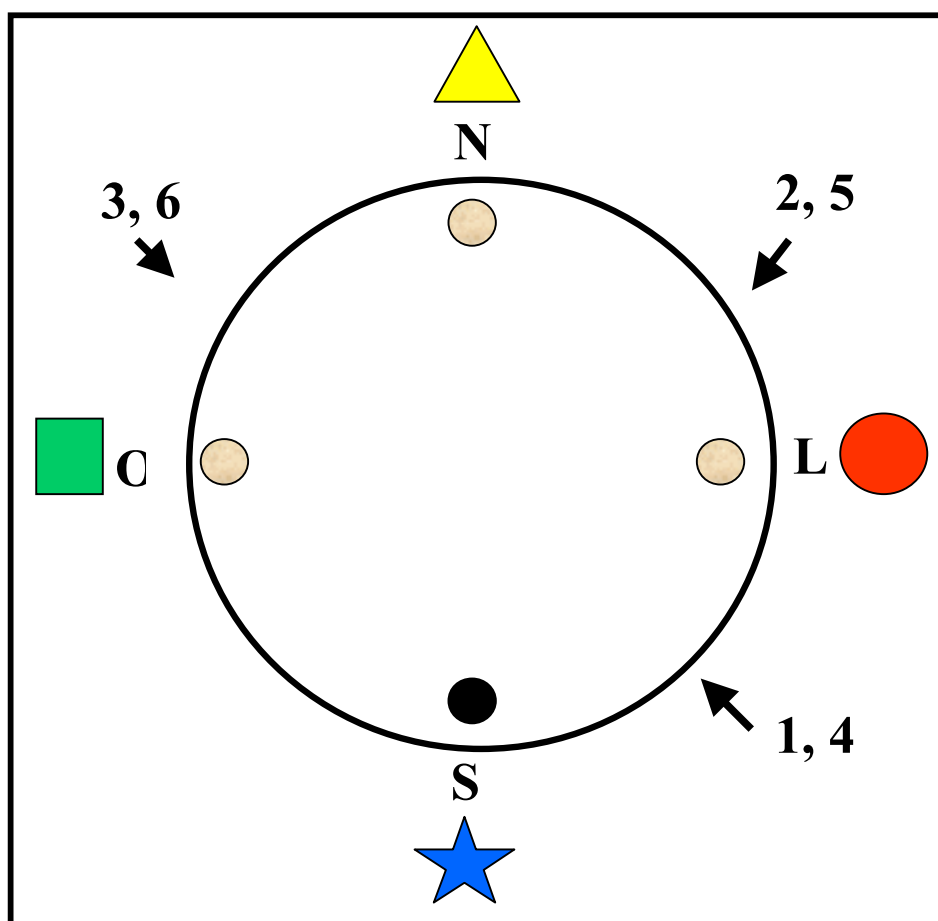


Figura 1: Representação esquemática da situação experimental de treino em escolha espacial. As setas indicam os pontos onde o animal foi liberado nas tentativas indicadas pelos números. O círculo em preto indica o comedouro correto; as figuras geométricas externas à arena representam as pistas colocadas nas paredes da sala. N: norte; S: sul; L: leste; O: oeste.

3.4. Procedimentos

3.4.1 Adaptação às condições do biotério: Durante um período mínimo de quinze dias antes do experimento, os pombos permaneceram no biotério, sob ciclo claro-escuro de 12:12 h (luz acendendo às 6:00 h, para adaptação a essas condições. Os animais de todos os grupos foram manipulados no mesmo horário que ocorreu o experimento, às 8:00 h, nos quatro dias que o precederam.

3.4.2 Controle de peso e privação alimentar: Após os 15 dias de adaptação os animais passaram por pesagem diária durante 7 dias para cálculo do peso médio *ad libitum*. A seguir, passaram por privação alimentar, com água à vontade e redução gradual da oferta de alimentação até que o animal atingisse o peso experimental equivalente a 80% do peso *ad libitum* (peso experimental) o que ocorria entre 7 a 10 dias após o início da privação alimentar.

3.4.3 Habituação à arena experimental: Os pombos passaram por 20 min de habituação diária à arena experimental por dois dias consecutivos. Nessas sessões os animais tiveram duas exposições à arena, com acesso ao espaço experimental por 10 min, sem apresentação de qualquer estimulação programada. Entre as exposições eram colocados numa gaiola de espera durante 5 min.

3.4.4 Treino de curta duração em escolha alimentar: O treino consistiu numa única sessão com 6 tentativas experimentais, sendo que em cada uma delas o animal era colocado na arena com acesso aos comedouros, um dos quais continha alimento. A cada tentativa, o animal foi liberado na arena em quadrantes pré-estabelecidos (ver Figura 1). A resposta de escolha foi definida como aproximar-se, orientar-se e bicar um comedouro. Quando o animal escolhia o comedouro com alimento, considerava-se a ocorrência de escolha correta; a escolha de um dos outros três comedouros era considerada como escolha incorreta. O tempo entre a liberação do animal na arena e a

primeira bicada num dos comedouros foi registrado como latência da resposta de escolha. Após uma escolha correta o animal tinha acesso ao alimento por 30 s, ao final dos quais terminava a tentativa e era então conduzido a uma caixa de espera onde permanecia por 5 min (intervalo entre tentativas). Ao final da sexta tentativa o animal era reconduzido à gaiola-viveiro no biotério. As tentativas em que não ocorria resposta de escolha tinham duração máxima de 10 min. Os animais dos grupos Controle (Cont) passaram pelo mesmo procedimento, porém os comedouros estavam vazios em todas as tentativas.

3.4.5 Treinamento de longa duração em escolha alimentar: O treino consistiu em 5 sessões, com intervalo de 24 h entre elas. Os procedimentos descritos para o treino de curta duração foram repetidos em cada uma das 5 sessões. O comedouro contendo alimento foi mantido na mesma localização durante todos os dias de treino. As relações espaciais entre os objetos da sala e a posição do comedouro nesse espaço permaneceram constantes ao longo de todo o experimento, um arranjo que possibilitava que o animal utilizasse essas informações espaciais para encontrar rapidamente o comedouro com alimento. Os animais do grupo Cont5 passaram pelo mesmo procedimento, porém os comedouros estavam vazios em todas as tentativas das 5 sessões.

3.5. Coleta de Amostras:

Os animais dos grupos Experimentais com 1 dia de treino (Exp1) e os respectivos controles (Cont1) foram sacrificados 1:30h após o início da sessão de treino; os animais com 5 dias de treino e os respectivos controles foram sacrificados 1:30h após o início da quinta sessão de treino; os animais do grupo Manipulação foram sacrificados 1:30h após a sua manipulação e pesagem .

Os animais foram anestesiados com ketamina (20mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e imobilizados na mesa de perfusão, adaptada a uma pia para escoamento de líquidos. Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal bilateral ao longo do osso esterno. Com uma tesoura cirúrgica, realizou-se toracotomia, expondo os órgãos da cavidade torácica, identificando-se o ventrículo esquerdo onde foi inoculado 0,3 ml (3 unidades) de heparina (Roche). Logo após infundiu-se 250-300 ml de solução salina (NaCl 0,9%) por meio de uma agulha (número 16), posicionada, em direção à válvula aórtica e conectada ao sistema de perfusão por uma cânula. Imediatamente antes da infusão, realizou-se uma incisão no átrio direito para permitir o escoamento de sangue, salina e fixador. Quando o líquido escoado estava claro, foram perfundidos 250-300ml de solução de Paraformolaldeído 4% (PFA) em tampão PB (0,1 M; pH 7,4). A seguir, após decapitação, o cérebro de cada animal foi removido e mantido em solução de PFA por 6 h e a seguir colocados em solução crioprotetora de sacarose 30% por 48 horas.

3.6. Processamento histológico

3.6.1 O processamento e corte do material:

O cérebro foi processado para congelamento e cortes de 40 µm em criostato. Para fins de análise do hipocampo, os cortes se deram numa extensão de 3750 µm, seguindo o atlas de Karten & Hodos (1967): abrangendo extensão entre as coordenadas A 8.75 - 7.75 até A 6.50-5.00. Os cortes eram coletados e depositados em recipientes contendo uma solução de PB 0,1M, pH 7.4 e, a seguir, processados por imunohistoquímica para nNOS pelo método que utiliza cortes em imersão (*free-floating*).

3.6.2 Procedimentos imunohistoquímicos:

A imunohistoquímica para nNOS envolveu uma sequência de procedimentos que perdurou por 2 dias. Inicialmente, os cortes passaram por três lavagens de 10 min cada

em PB. A seguir foram incubados com o anticorpo primário policlonal produzido em coelho nNOS (NOS1, R-20; SC-648, Santa Cruz) a uma concentração de 1:1000 em uma solução de Triton X-100 (1:100), contendo 2% de soro normal de cabra, onde permaneceram por 24 horas. Após esse período, foram submetidos a três lavagens em PB de 10 min cada. Posteriormente foram incubados, durante 60 min, com o anticorpo secundário biotilado (DK-Rb, Jackson) em TX100 - PB, permanecendo em agitação leve, à temperatura ambiente. Imediatamente após esse período de incubação, os cortes foram novamente submetidos a três lavagens em PB de 10 min cada. E seguida foram incubados em uma solução contendo o complexo ABC (complexo avidina-biotina, 10 µl de A e 10 µl de B), em 980 µl de TX100-PB e cloreto de sódio, durante 60 minutos, permanecendo em agitação, à temperatura ambiente. Após esses procedimentos, os cortes foram submetidos novamente a três lavagens de 10 min cada, em PB. Foram então colocados em solução de diaminobenzidina (DAB) em PB, acrescentando-se 0,3 ml de H₂O₂ 0,03% por um período de 3 a 5 min, e novamente submetidos a três lavagens de 10 min cada, em PB, concluindo a etapa denominada revelação. Os cortes controles foram processados com omissão do anticorpo primário.

Subseqüentemente, os cortes imersos numa solução de PBS 0,1M (pH 7.4) foram transferidos para um recipiente contendo solução de montagem (água destilada, PB, etanol e gelatina) de onde eram retirados e sobrepostos a lâminas. Após 7 dias em câmara de secagem foi feita a desidratação dos cortes mediante a exposição a uma série crescente de alcoóis (70%, 90%, 100%,100%) com um período de 1 min em cada álcool, e ao clareador (Hemo-De), sendo retirada do excesso, colocou-se lamínula.

3.7. Análise dos Dados Comportamentais

As gravações em VHS das sessões de treino dos animais CONT1, EXP1, CONT5, EXP5 foram transcritas com registros de latência, em segundos e número de escolhas corretas. Os dados de latência eram obtidos por meio de um cronômetro. Os registros foram discutidos e revistos por observadores-controle, para fins de controle de validade dos dados.

3.8. Análise da marcação de células nNOS-positivas

A análise das marcações foi feita através de microscopia, sendo que os neurônios imunorreativos para nNOS em regiões do hipocampo foram previamente definidas. Para facilitar a coleta do material e sua análise o hipocampo foi dividido em três níveis de acordo com o atlas de KARTEN & HODOS, 1967, Nível 1 coordenadas 8.75 - 7.75, onde observa-se o quiasma óptico; Nível 2 de coordenadas 7.75 - 6.50 e o Nível 3 considerando 6.50 - 5.00 onde destaca-se o início do tecto óptico.

A Figura 2 mostra uma representação esquemática da divisão regional do hipocampo de pombos usado neste estudo: região dorsal (HpD), indicada por cinza claro; região ventro-medial (HpVM), indicada em preto e região ventro-lateral (HpVL), indicada em cinza escuro.

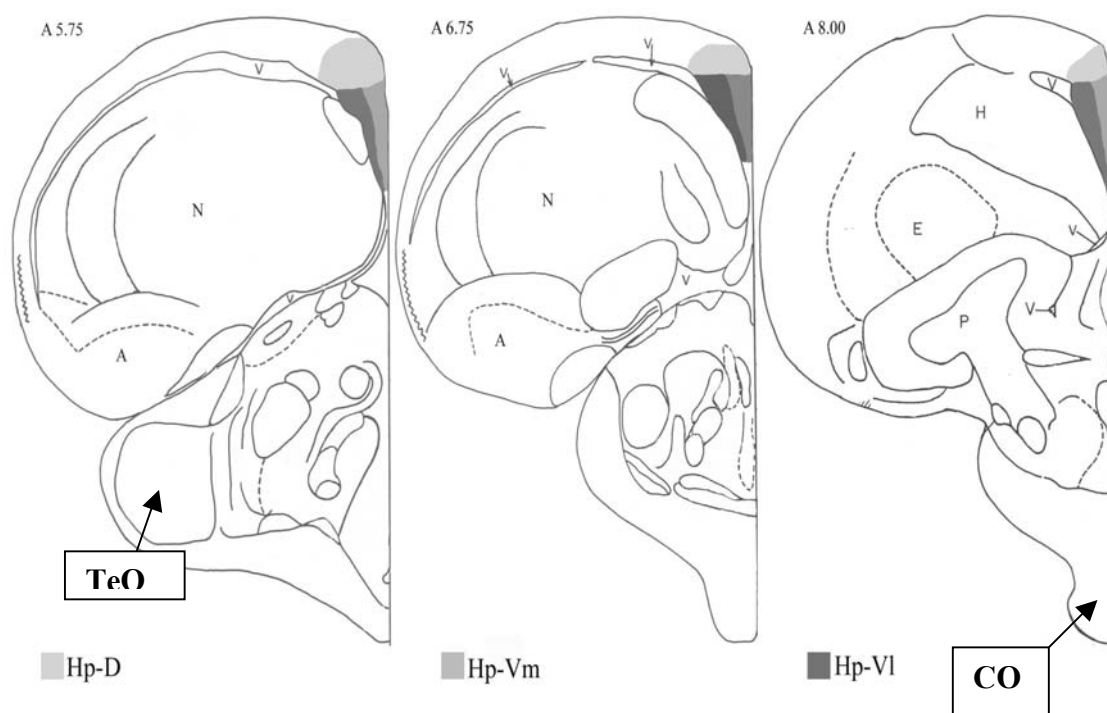


Figura 2 - Esquema de cortes frontais de encéfalos de pombos nos níveis A5. 75, A 6.75 e A8.00 (Karten e Hodos, 1967). N (Neostriatum), A (Arquestriatum), P (Paleostriatum), H (Hiperstriatum), E (Ectostriatum), V (Ventrículo), TeO (Tectum Opticum), QO Chiasma Opticum (Modificado de Brito et al., 2006).

A contagem das células marcadas seguiu o critério de delimitação virtual das regiões dorsal e ventral (ventro-lateral e ventro-medial). Em cada região as células nNOS-positivas foram aferidas por contagem unitária. Foram computadas células que com corpos celulares e ramificações nítidas com coloração de tonalidade amendoada até o marrom escuro. A contagem foi discutida e revista por observadores-controle (duplo-cego), para fins de controle de validade dos dados. As imagens das células imunorreativas foram tratadas pelo programa Adobe Photoshop a fim de que fossem aprimorar a nitidez e a coloração dos corpos celulares e projeções dendríticas e axonais.

3.9. Análise Estatística

A análise estatística dos valores de latência registrados no teste de aprendizagem foi realizada por meio da Análise da Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey-Kramer para comparação entre grupos.

Os números de células com imunorreação para nNOS foram analisados pelo teste ANOVA, considerando-se grupo e região do hipocampo como fatores. Para múltiplas comparações *post hoc* foi usado o teste de Tukey-Kramer. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa NCSS (versão 2004) considerando os valores significantes de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análise dos dados comportamentais

Na Figura 3 é apresentada a latência média da resposta de escolha em função das tentativas ao longo da sessão I de treinamento. Os valores médios da latência ao longo primeira sessão não foram significativamente diferentes entre os grupos EXP1 e EXP5 ($F_{1,13}=0,22$; $p>0,05$). A análise das comparações com ANOVA duas vias indicou diferença estatisticamente significativa entre as tentativas ($F_{5,13} = 18,14$; $p<0,001$), mas não entre os grupos ($F_{1,13} = 0,22$; $p>0,05$). O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que a primeira tentativa no grupo EXP5 foi diferente das tentativas T4, T5 e T6 do mesmo grupo e, no grupo EXP1, a primeira tentativa foi diferente das tentativas T5 e T6 ($p<0,05$).

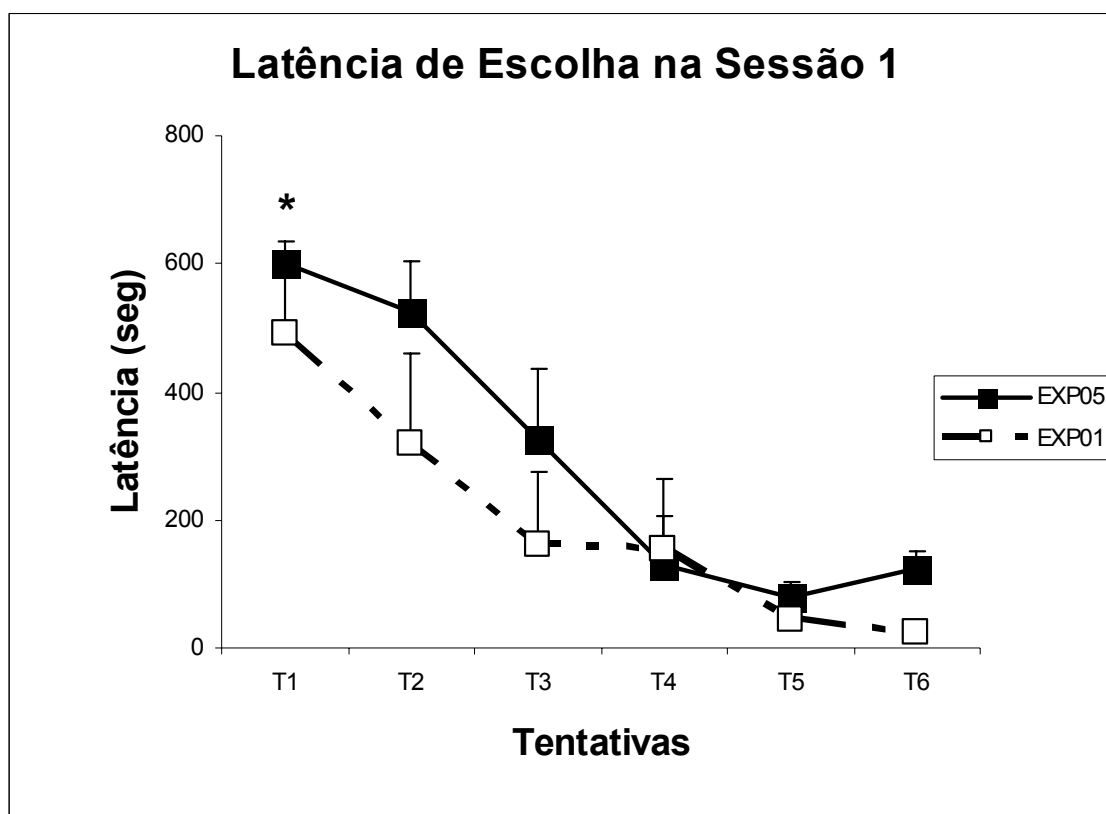


Figura 3 – Latência média da resposta de escolha (seg) em função das tentativas na Sessão 1 do treino, para os grupos Experimental 1 dia (EXP1) e Experimental (EXP5). * $p < 0,05$ em relação a T4, T5 e T6; # $p < 0,05$ em relação a T5 e T6.

A Figura 4 apresenta a latência média da resposta de escolha em função das tentativas ao longo das cinco sessões de treinamento. A análise das comparações com ANOVA duas vias indicou significância estatística entre as sessões de treinamento do grupo EXP5 ($F_{4,28}=23,74$; $p<0,001$). A análise dos valores de latência média no grupo EXP5 também mostrou diferença significativa entre as tentativas ($F_{5,28}=9,41$; $p<0,001$) e interação significativa entre sessão e tentativa ($F_{5,35}=7,87$; $p<0,001$). O teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que a primeira sessão do grupo EXP5 foi diferente das demais ($p<0,05$). A tentativa T1 da primeira sessão foi significativamente diferente das tentativas T4, T5 e T6 da mesma sessão ($p<0,05$) e das primeiras tentativas das sessões 2, 3, 4 e 5 ($p<0,05$).

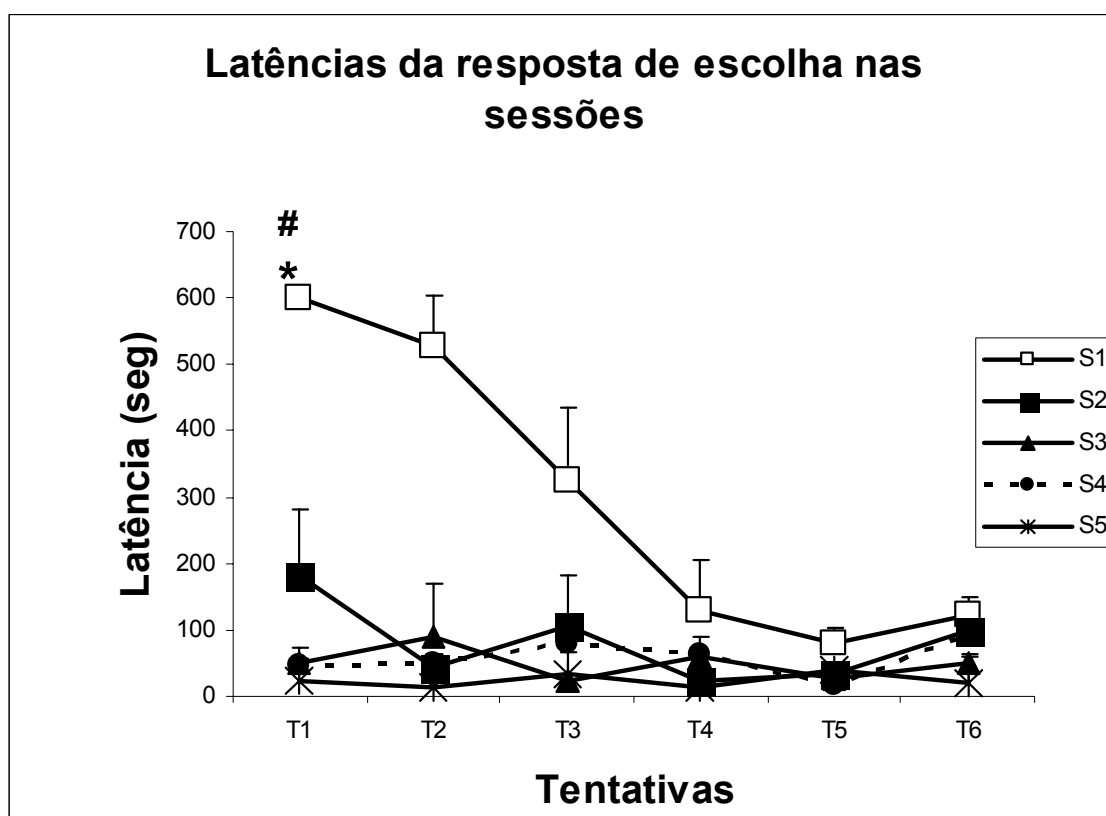


Figura 4 – Latência média da resposta de escolha (seg) em função das tentativas ao longo das Sessões 1, 2, 3, 4 e 5 do treino, para o grupo Experimental (EXP5). * $p < 0,05$ em relação às tentativas das outras sessões; # $p < 0,05$ em relação às tentativas T4, T5 e T6 da primeira sessão.

A Figura 5 é indica a latência média da resposta de escolha ao longo das cinco sessões de treinamento. A análise das comparações com ANOVA de uma via demonstrou diferença estatística entre a média das latências nas 5 sessões de treinamento para o grupo EXP5 ($F_{4, 235}=27,75$; $p<0,001$). O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que a latência média na primeira sessão do grupo EXP05 foi diferente das demais ($p<0,05$).

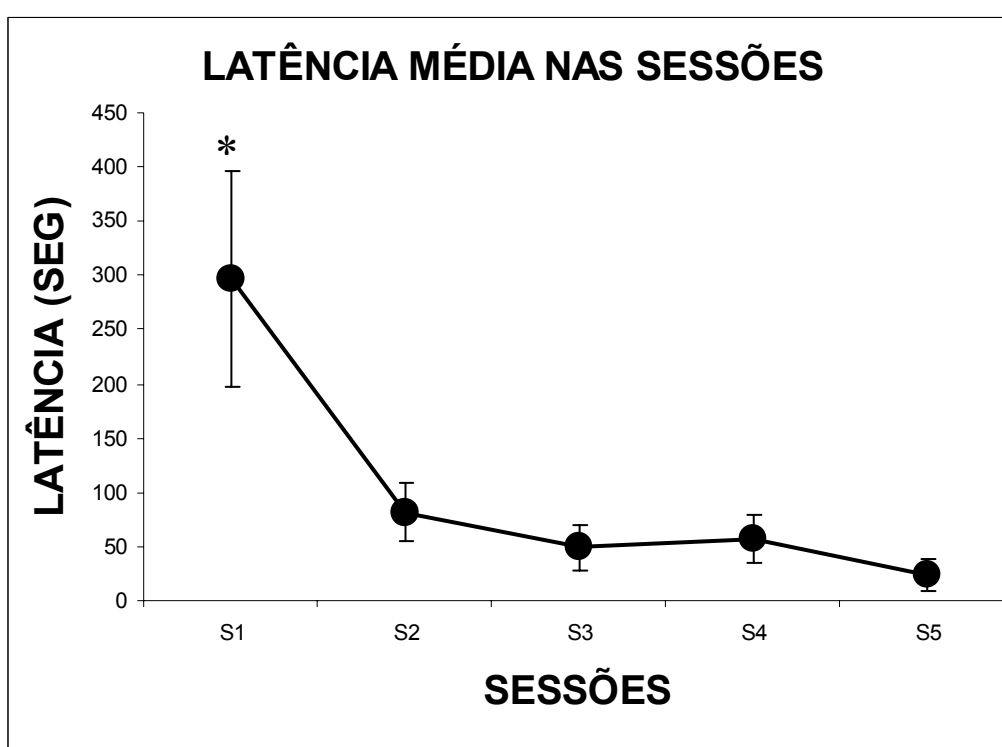


Figura 5 – Latência média da resposta de escolha (seg) ao longo das Sessões 1, 2, 3, 4 e 5 do treino, para o grupo Experimental (EXP5). * $p < 0,05$ em relação às outras sessões.

Na Figura 6 é apresentado o índice de resposta de escolhas corretas ($IE = \text{Escolhas Corretas} / \Sigma EC + EI + O$) calculado para cada uma das cinco sessões de treinamento. Os dados analisados por meio de ANOVA de uma via indicam diferença significativa do índice de escolhas corretas entre as sessões de treinamento do grupo EXP5 ($F_{4,35}=8,66$; $p<0,001$). O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que a última sessão do grupo EXP05 foi estatisticamente diferente das sessões I, III e IV ($p<0,05$).

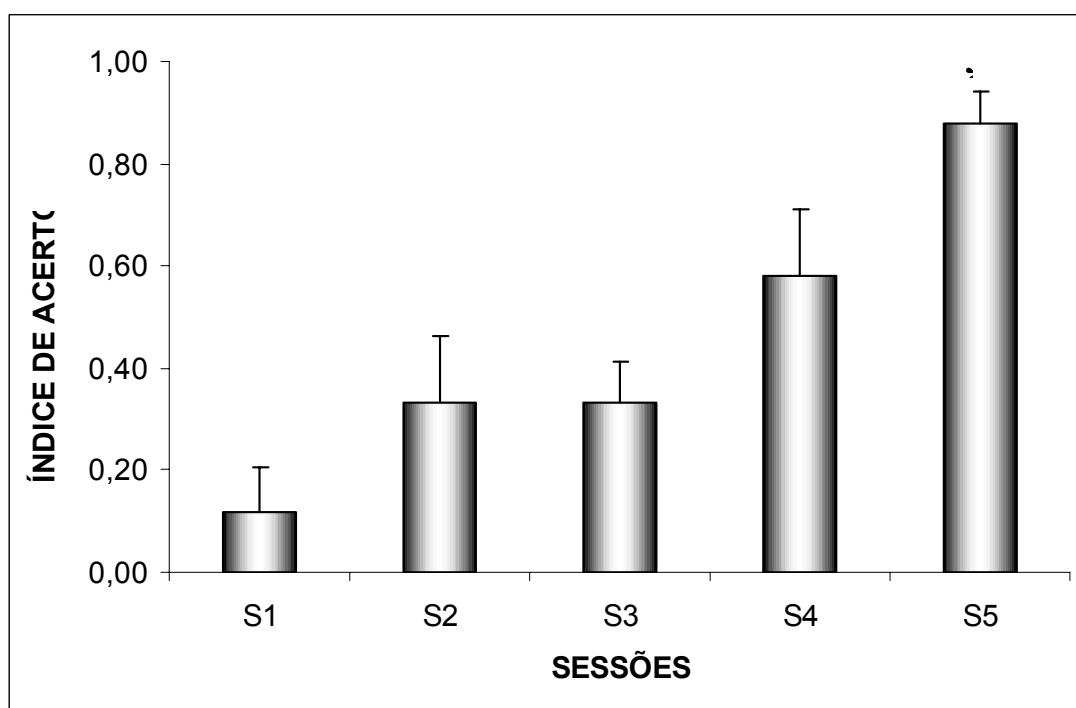


Figura 6 – Valores médios do Índice de resposta de escolhas corretas ($IE = \text{Escolhas Corretas} / \Sigma EC + EI + O$) para as Sessões 1, 2, 3, 4 e 5 do treino, para o grupo Experimental 5 dias (EXP5). * $p < 0,05$ em relação às sessões 1, 2 e 3.

4.2. Análise da distribuição de células nNOS-positivas

Na Figura 7 é apresentado o número médio (+ e.p.m) das células nNOS-positivas no Hp para cada grupo de animais. Os valores médios foram calculados a partir do total de células registrado nas três regiões do hipocampo: dorsal (HpD), ventro-lateral (HpVL) e ventro-medial (HpVM). O número médio de células marcadas no EXP5 significativamente maior em relação aos grupos MAN, CONT1, EXP1 e CONT5. As comparações com ANOVA de uma via confirmaram a diferença significativa entre grupos ($F_{4,22} = 13,14$; $p < 0,001$). O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que o grupo EXP05 foi diferente de todos os outros grupos ($p < 0,05$).

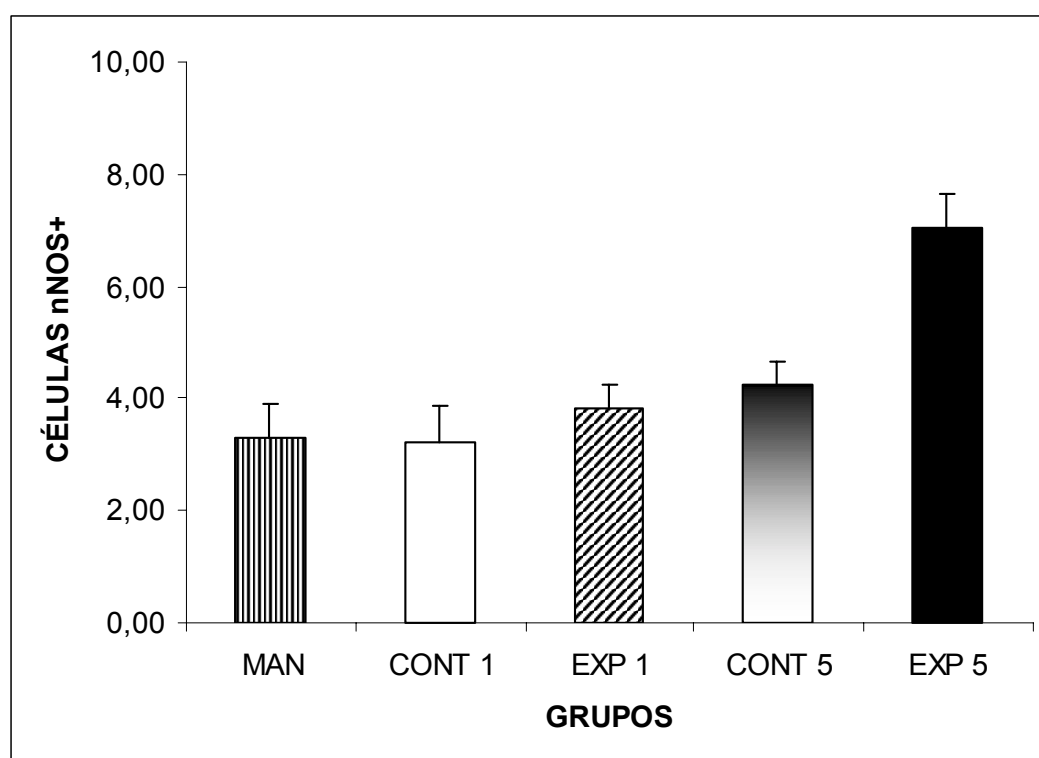


Figura 7 – Número médio de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos para os grupos Manipulação (MAN), Controle 1 dia (CONT1), Experimental 1 dia (EXP1), Controle 5 (CONT5), Experimental 5 (EXP5). Os valores médios consideram a somatória das medidas realizadas nas regiões dorsal e ventral, nos níveis I, II, III. * $p < 0,05$ em relação aos outros grupos.

A Figura 8 apresenta valores médios (+e.p.m) de células nNOS-positivas no HpD e HpV, possibilitando a comparação da marcação nas regiões dorsal e ventral do hipocampo dos animais de cada grupo. Em todos os grupos observam-se valores mais elevados de células imunorreativas na região dorsal em comparação com a ventral, sendo que o maior valor de células marcadas ocorre em HpD para o grupo EXP5. Essas observações foram confirmadas estatisticamente pela ANOVA como efeito de grupo ($F_{4,22}=10,17$; $p<0,001$) e de região ($F_{4,22}=104,79$; $p<0,001$). O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações confirmou as diferenças entre a porção dorsal de EXP5 em relação à porção ventral e as demais regiões de todos os grupos ($p<0,05$).

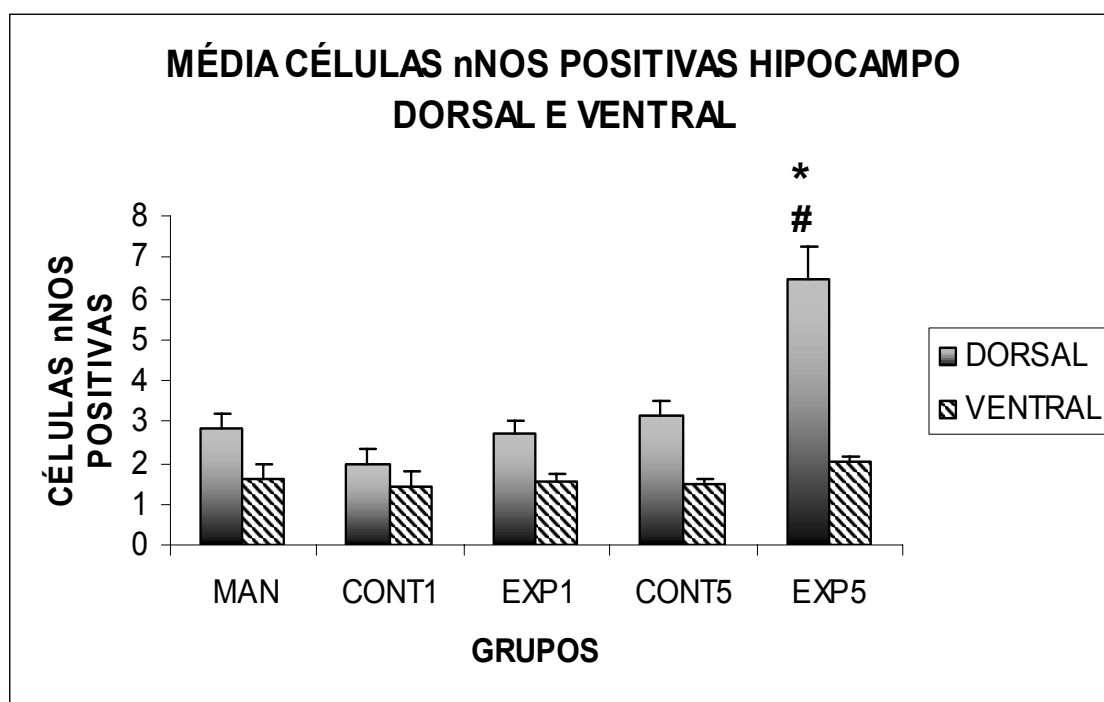


Figura 8 – Número médio (+ erro padrão da média) de células nNOS-positivas nas regiões dorsal e ventral do hipocampo de pombos dos grupos Manipulação (MAN), Controle 1 dia (CONT1), Experimental 1 dia (EXP1), Controle 5 (CONT5), Experimental (EXP5). Os valores da região ventral consideram a somatória das medidas realizadas em HpVL e HpVM em cada grupo. * $p<0,05$ em relação à região dorsal dos outros grupos e # $p<0,05$ em relação à reg *Resultados* de todos os grupos.

A Figura 9 compara o número médio (\pm e.p.m) das células nNOS positivas nas duas sub-regiões do HpV: ventro-lateral (HpVL) e ventro-medial (HpVM). Os valores correspondem, em cada grupo, ao número médio de células marcadas obtido em HpVL e HpVM. Nos grupos EXP1 e EXP5 observa-se que a marcação da imunorreação para nNOS variou entre as regiões HpVL e HpVM. A ANOVA indicou diferenças significativas entre as regiões ($F_{1, 22}=27,53$; $p<0,001$), mas não entre os grupos ($F_{4, 22}=0,87$; $p>0,05$). O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* confirmou que no grupo EXP5 houve diferença significativa na marcação imunorreativa para nNOS nas regiões HpVM e HpVL ($p<0,05$). Também, o número de células nNOS-positivas no HpVM do grupo EXP5 foi diferente daquela do HpVM do grupo EXP1 ($p<0,05$).

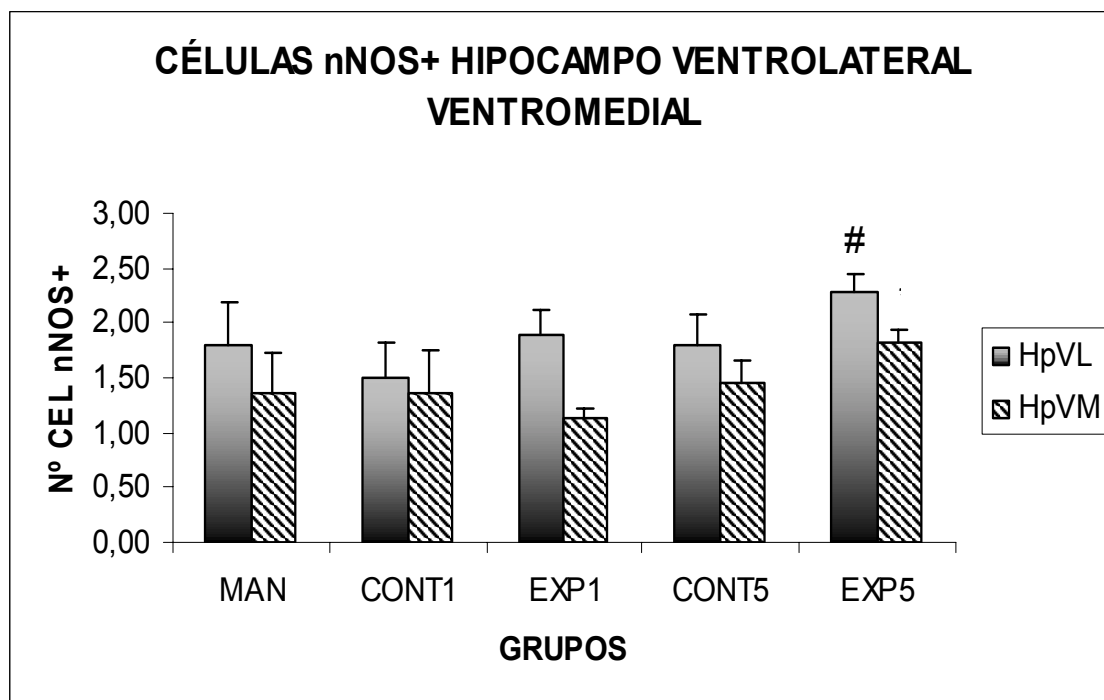


Figura 9 – Número médio (+ erro padrão da média) de células nNOS-positivas nas regiões ventro-lateral (HpVL) e ventro-medial (HpVM) do hipocampo de pombos para os grupos Manipulação (MAN), Controle 1 dia (CONT1), Experimental 1 (EXP1), Controle 5 (CONT5), Experimental (EXP5). Os valores médios consideram a somatória das medidas realizadas nos níveis I, II, III em cada sub-região do HpV. * $p < 0,05$ em relação ao HpVm do Exp 1; # em relação ao HpVM do EXP5.

Na Tabela 1 é apresentada a comparação do número médio (+e.p.m) das células nNOS positivas considerando-se a marcação nas regiões dorsal e ventral do hipocampo. Observam-se valores mais elevados de células imunorreativas no HpD em comparação com HpV, principalmente no grupo EXP5. Essas observações foram confirmadas estatisticamente pela ANOVA como efeito de grupo ($F_{4,22}=10,17$; $p<0,001$) e de região ($F_{4,22}=104,79$; $p<0,001$).

TABELA 1- Porcentagem (+ erro padrão da média) de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos para os grupos Controle 1 dia (CONT1), Experimental 1 dia (EXP1), Controle 5 (CONT5), Experimental (exp5) em relação ao grupo Manipulação (100%) . Os valores as medidas realizadas nas regiões dorsal e ventral (ventro-lateral e ventro-medial) * $p < 0,05$ em relação aos outros grupos

GRUPO	REGIAO	CÉLULAS n+ NOS	
		MÉDIA %	EPM
CONT 1	HPD	71,18 %	0,03
	HPVL	83,33 %	0,25
	HPVM	98,54 %	0,30
EXP 1	HPD	96,44 %	0,10
	HPVL	105 %	0,08
	HPVM	81,75 %	0,08
CONT 5	HPD	102,84 %	0,20
	HPVL	97,78 %	0,16
	HPVM	94,89 %	0,02
EXP 5	HPD	229,89 % *	0,38
	HPVL	126,67 %	0,12
	HPVM	132,85 %	0,04

* ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

A Figura 10 apresenta imagens digitalizadas de secções do HpD de pombos dos grupos MAN, CONT1, EXP1. Observa-se a marcação nítida, em tons de coloração marrom, de neurônios imunorreativos para nNOS. No detalhe de cada imagem observa-se, em maior detalhe os tipos neuronais nNOS-positivos. Barras: 100 μ m (A, B e C); 30 μ (D, E F).

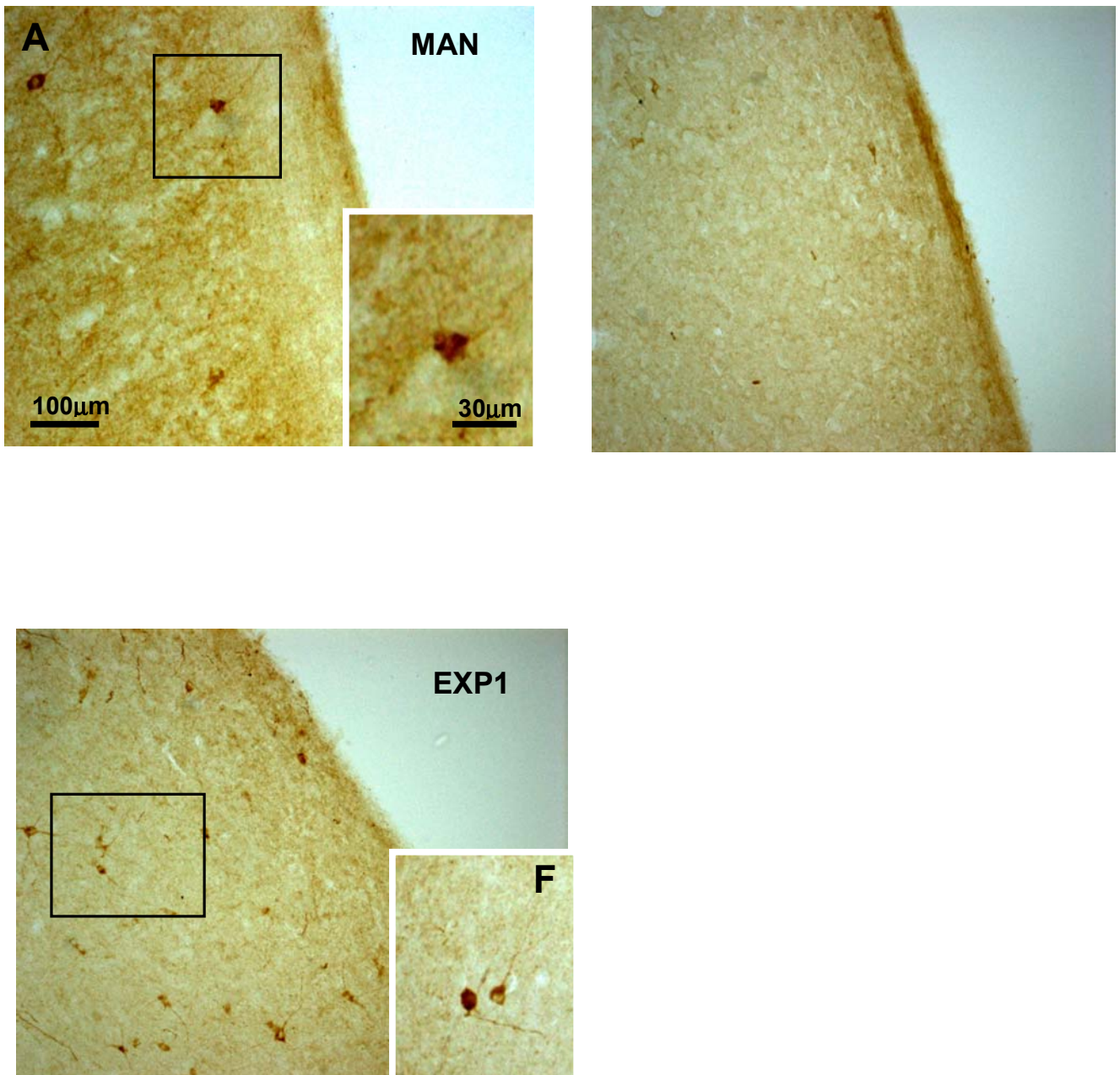


Fig.10: Células nNOS+ HpD para os grupos MAN, CONT1, EXP1
Barras:100µm (A, B e C); 30µ (D,E e F)

Na Figura 11 são apresentadas imagens digitalizadas de secções do HpD de pombos dos grupos CONT5 e EXP5. Observa-se a marcação nítida, em tons de coloração marrom, de neurônios imunorreativos para nNOS. No detalhe de cada imagem observa-se, em maior detalhe os tipos neuronais nNOS-positivos. Barras: 100 μ m (A e B); 30 μ m (C e D)

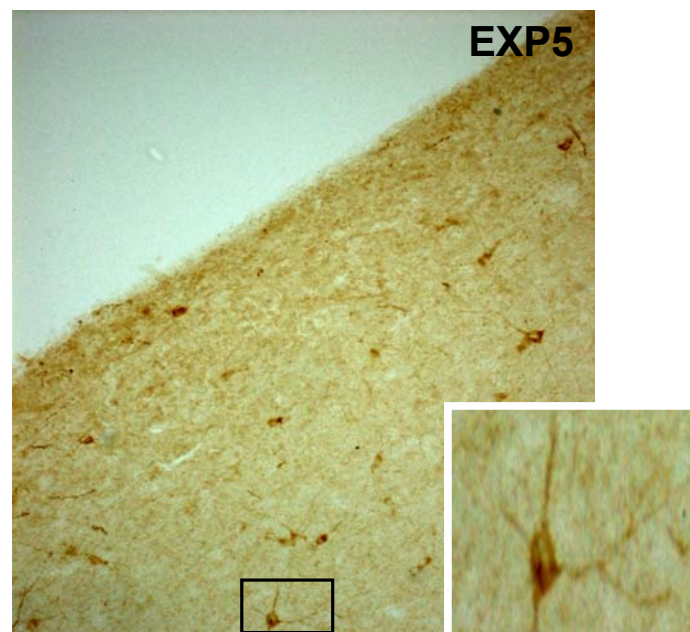
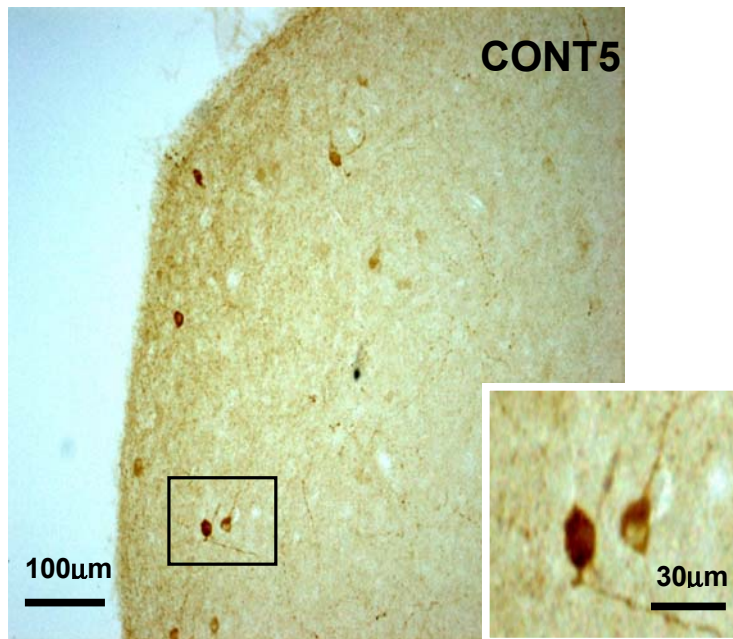


Fig.11: Células nNOS+ HpD para os grupos CONT5, EXP5
Barras: 100µm (A e B); 30µ (C e D)

Na Figura 12 são apresentadas imagens digitalizadas de secções do HpV de pombos dos grupos MAN, CONT1, EXP1. Observa-se a marcação nítida, em tons de coloração marrom, de neurônios imunorreativos para nNOS. No detalhe de cada imagem observa-se, em maior detalhe os tipos neuronais nNOS-positivos. Barras: 100 μ m (A, B e C); 30 μ m (D, E F)..



**Fig.12: Células nNOS+ HpV
para os grupos MAN,
CONT1, EXP1
Barras:100µm (A, B e C);
30µ (D,E e F)**

Na Figura 13 são apresentada imagens digitalizadas de secções do HpV de pombos dos grupos CONT5, EXP5. Observa-se a marcação nítida, em tons de coloração marrom, de neurônios imunorreativos para nNOS. No detalhe de cada imagem observa-se, em maior detalhe os tipos neuronais nNOS-positivos. Barras: 100 μ m (A, B e C); 30 μ m (D, E F)..

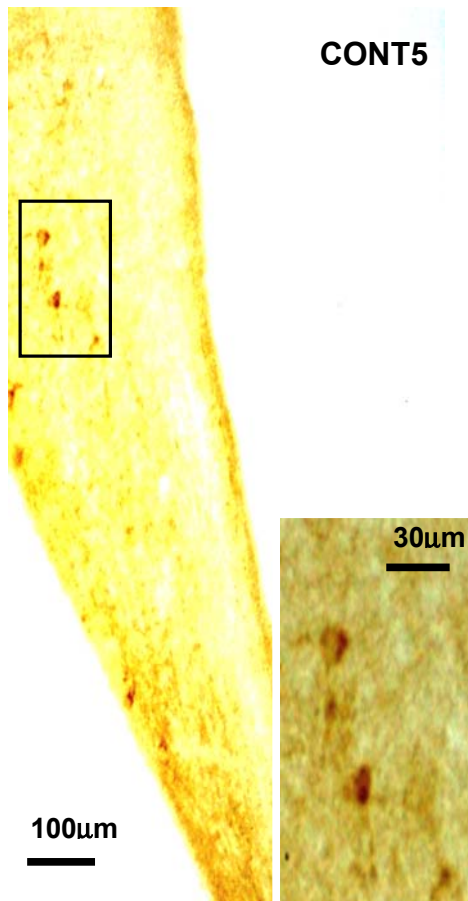
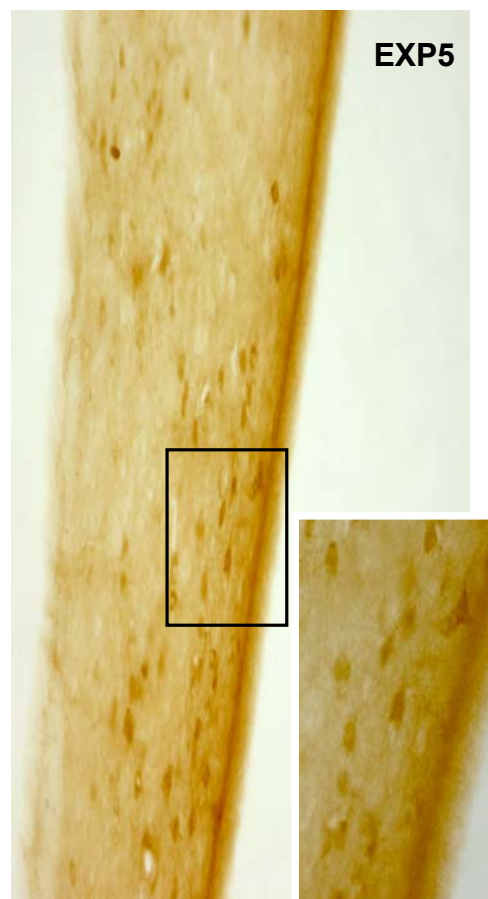


Fig.13: Células nNOS+ HpV para os grupos MAN, CONT5, EXP5
Barras:100µm (A e B) ; 30µ (C e D)



Na Figura 14 são apresentada imagens digitalizadas de secções do Hp de pombos considerando-se a marcação na região ventral, sendo ventro-medial para grupo MAN e ventro-lateral para os grupos CONT5, EXP5. Barras: 50 μ m .

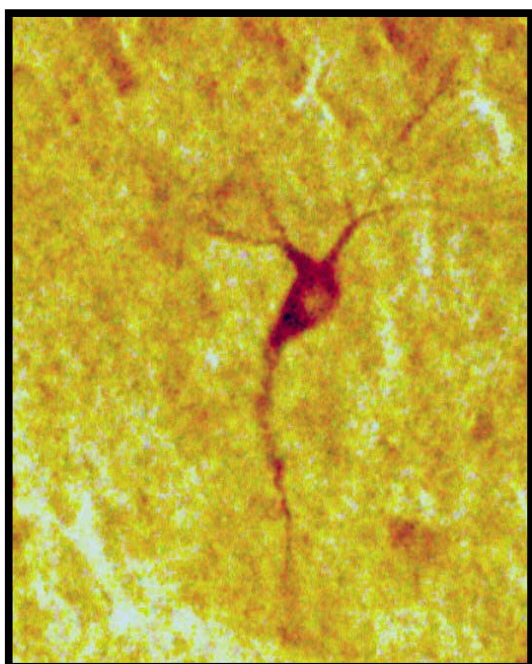


Fig.14: Tipos Neuronalis-Células nNOS+ HpV para os grupos MAN (HpVM), CONT5 (HpVL) e EXP5 (HpVL). Barras:50µm

5. Discussão

O presente estudo permitiu avaliar modificações comportamentais e alterações na marcação de células nNOS-positivas no hipocampo em pombos submetidos ao treino em aprendizagem de escolha alimentar numa arena com quatro comedouros. Os animais do grupo treinado em uma única sessão mostraram diminuição de latência de resposta de escolha ao longo das tentativas da sessão, evidenciando a resposta de escolha nessa sessão, porém com baixo índice de acerto. O grupo treinado durante 5 sessões aprendeu a escolher o comedouro com alimento (correto) reduzindo as latências e com aumento dos índices de acerto ao longo das sessões. Os animais dos grupos controles não apresentaram respostas de escolhas, limitando-se a explorar visualmente o ambiente experimental. A análise da marcação imunoistoquímica de células nNOS-positivas no hipocampo indicou marcação significativamente maior para o grupo EXP5, em relação ao grupo EXP1 e aos grupos- controles MAN, CONT1, e CONT5 que não foram expostos a contingências de aprendizagem espacial. Esses dados sugerem que o treino prolongado induziu aumento da expressão da nNOS no hipocampo, expressa pelo aumento da imunorreação de células nNOS-positivas. Desse modo, os resultados acrescentam informações inéditas quanto aos efeitos da duração do treino em aprendizagem de localização espacial na marcação de células nNOS-positivas no Hp de pombos.

Os dados obtidos indicam que o treinamento nas sessões experimentais foi eficiente para a aprendizagem da resposta de escolha alimentar. Houve uma diminuição da latência média da resposta de escolha em função das tentativas ao longo da sessão que já foi evidenciada na primeira sessão de treino tanto para EXP1 quanto para EXP5. Como nessa situação experimental o comedouro permanecia numa mesma localização em todas as tentativas, é possível considerar que as curvas de latência da primeira

sessão evidenciam um processo inicial de aquisição da memória de referência (AMARAL-TOMA 2003). A diminuição da latência nas sucessivas tentativas indica o processamento de memória de curto prazo (IZQUIERDO *et al.*, 1999 e 2000).

Quando se analisa a latência de escolha do comedouro correto ao longo das tentativas de cada sessão, verifica-se que modificações na latência ao longo das sessões e entre as sessões. A latência na tentativa inicial da primeira sessão é significativamente maior em comparação com as outras sessões e o mesmo acontece com a latência da tentativa inicial nas resposta ao longo das três primeiras sessões. Como resultado, temos um processo de diminuição gradual da latência de escolha entre as cinco sessões de treino. Essa diminuição da latência evidencia uma mudança comportamental que expressa a aprendizagem da escolha e a operação de processos de memória de longa duração. Paralelamente à diminuição da latência, observou-se um processo inverso no número de escolhas corretas que aumentaram gradualmente a cada sessão do EXP5, atingindo índice de acerto maior que 80% na quinta sessão. Desse modo, nossos dados confirmam observações já descritas para pombos em situação experimental comparável à do presente trabalho (AMARAL-TOMA, 2004; WATANABE, 2002). Por outro lado, também estão em acordo com os relatos de para aprendizagem espacial em roedores com escolha alimentar (BROWN *et al.*, 2002; VAN DEN BERGH *et al.*, 2006, GASKIN e WHITE, 2006).

Amaral-Toma e Ferrari (2004) avaliaram os efeitos de lesões hipocampais na aprendizagem e memória espaciais em pombos submetidos a treino e testes de escolha alimentar. O procedimento experimental utilizado foi o mesmo que o do presente estudo. Watanabe et al (2004) também usou um procedimento similar para analisar a função do hipocampo na memória espacial de pássaros zebra finches. Tanto o estudo de Amaral-Toma (2003) quanto o de Watanabe et al. (2004) tiveram como objetivo

investigar a aprendizagem espacial em aves com procedimentos semelhantes aos que são usados com roedores. Para isso, basearam-se no estudo de Fremouw *et al.* (1997) que originalmente propôs esse procedimento como uma versão seca do labirinto de Morris (WATANABE, 2004; AMARAL-TOMA e FERRARI, 2004). Apesar dessa proposição e da adequação do procedimento para a investigação da aprendizagem espacial em aves, deve ser lembrado que o labirinto aquático de Morris constitui uma situação de resposta de fuga, com reforçamento negativo, enquanto que o nosso procedimento constitui uma situação de escolha reforçada positivamente.

A análise da imunorreação das células hipocâmpais para nNOS indicou a presença de células com marcação positiva nas diferentes sub-regiões hipocâmpais, em todos os grupos de animais. Porém, observou-se que ocorreu maior número de células nNOS positivas no HpD do EXP5. Esses dados que mostram a distribuição diferencial da marcação das células nNOS-positivas nas regiões hipocâmpais colocam várias questões.

Primeiramente, a região HpD apresentou maior imunorreatividade para nNOS em comparação ao HpV principalmente observada para os animais do grupo EXP5 que diferiram do grupo MAN, CONT1, EXP1 e CONT5. Essa maior proporção de marcação de células nNOS-positivas nos animais do grupo EXP5 indica que o processo de aprendizagem analisado envolveu circuitos hipocâmpais que utilizam o NO como mensageiro neural com maior ativação do HpD, observações que estão em acordo com inúmeros estudos que indicam a participação do HpD em processos de aprendizagem e memória foi enfatizada em inúmeros estudos. (BAADER, 1996; ZHANG *et al.*, 1998; PELAGIO, 2006). Por exemplo, FERBINTEANU *et al.* (2003) avaliaram os animais que tiveram lesões hipocâmpais dorsais e ventrais e verificaram que ambas resultaram em prejuízos na aquisição e aprendizagem das informações. Contudo o resultado mais interessante deste estudo se mostra na verificação de que as lesões dorsais ocasionam

maior déficit de desempenho. Tal dado sugere a maior ativação do HpD por meio de suas projeções atua na organização da aprendizagem espacial.

Por outro lado, a análise do número de células imunorreativas para nNOS no HpVL e no HpVM, sub-regiões do hipocampo ventral, indicou diferenças nos grupos EXP1, EXP5 e CONT5. As quais sugerem maior ativação do HpVL no hipocampo dos pombos expostos a treinamento mais longo. Embora no presente trabalho não tenha sido medida a atividade da NOS, a diferença de marcação entre os grupos sugere ativação da nNOS em função do treino prolongado na situação experimental. Mais ainda, essa ativação seria distribuída diferencialmente nas sub-regiões hipocampais. Pelagio (2006) analisou a imunomarcação de células nNOS positivas e a atividade da NOS dependente e independente de Ca^{+2} , após aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris em camundongos com estado epiléptico induzido por pilocarpina. Observou que a atividade da NOS dependente de Ca^{+2} foi significativamente maior nos animais treinados em aprendizagem espacial. Fornel *et al* (2006) relataram uma relação entre a maior atividade da NOS dependente de Ca^{+2} e a aprendizagem de habituação.

Os presentes dados também nos remetem a outros estudos que mostraram ativação regionalizada das sub-regiões hipocampais após aprendizagem. Britto *et al.* (2002) relataram a indução da expressão do gene *zenk* no hipocampo de pombos após o treinamento com associações som-choque. Sperandéo (2005) ampliou essas observações demonstrando a ativação da expressão desse gene durante a evocação da memória contextual aversiva em pombos. Nos dois estudos, houve maior densidade de núcleos neuronais Zenk-positivos no HpVm, em comparação com o HpD, indicando a regionalização da imunorreação para Zenk no hipocampo de pombos. Assim, na situação de condicionamento clássico aversivo ocorreu a maior ativação hipocampal, evidenciada por células Zenk-positivas, no hipocampo ventral, enquanto no presente

estudo a maior ativação de circuitos com processos sinápticos mediados por nNOS ocorreu no HpD. Em conjunto esses dados sugerem que diferentes tipos de aprendizagem e evocação de memória envolvem circuitos em diferentes regiões hipocampais.

Essa questão pode ser analisada à luz dos resultados do estudo de Kahn *et al* (2003) que descreveu um circuito tri-sináptico no hipocampo de aves, comparável ao existente no hipocampo de mamíferos. Assim, a circuitaria hipocampal envolve a região dorso-medial (DM), com as suas subdivisões em dorso-medial-dorsal (DMd) e dorso-medial-ventral (DMv) e a região ventral com suas subdivisões em região ventral lateral (VL) e região ventro-medial (VM). Tais evidências permitem a comparação das projeções presentes em hipocampo de aves e mamíferos. As fibras que chegam às áreas Dorso-lateral e Dorso-medial do hipocampo de aves permite são comparáveis à via perfurante de mamíferos, que se projeta do córtex entorrinal para o giro denteado. As projeções da área Dorso-medial para as áreas Ventro-medial e Ventro-lateral se assemelhariam às projeções do giro denteado para CA3 nos mamíferos e as conexões intrínsecas das áreas ventro-lateral e ventro-medial seriam comparáveis às fibras colaterais de Schaffer.

Assim, a maior marcação das células nNOS-positivas observada no HpD dos pombos EXP5 pode estar relacionada com a atividade induzida por diferentes tipos de informações que chegam até o hipocampo. As regiões hipocampais de aves recebem projeções do tálamo, hipotálamo, núcleo da banda diagonal, *locus coeruleus*, e núcleos da rafe (KRAYNIAK e SIEGEL, 1978; CASINI *et al.* , 1986; BINGMAN *et al.* , 1989). O processamento sináptico que, a partir de então, ocorre no HpD resultaria na transmissão de informações para o HpVM e HpVL ipsi e contralateralmente. Finalmente, o resultado desse processamento hipocampal iniciado no HpD seria a

ativação de vias que ativam o hipocampo contralateral e também eferentes hipocampais para o núcleo septal, banda diagonal e hipotálamo (KRAYNIAK e SIEGEL, 1978; CASINI *et al.*, 1986; BINGMAN *et al.*, 1989). É interessante notar que houve marcação de células nNOS-positivas no HpD, HpVL e HpVM sugerindo que neurônios que usam o NO participam de circuitos aferentes, extra e intra-hipocampais, como também de suas eferências. Nesse sentido, é interessante ressaltar que mesmos os animais MAN e CONT1 apresentam marcação de células nNOS-positivas em todas as regiões do Hp, embora significativamente mais escassa que a de EXP5. Uma outra observação a ser salientada é a presença de neurônios do HpV com intensa marcação para nNOS, que apresentavam como características corpos celulares triangulares e extensos processos com varicosidades que se estendiam desde os limites superiores do HpVM até seus limites inferiores. Neurônios desse tipo poderiam ser importantes para as conexões intrínsecas e extrínsecas do Hp de pombos.

Como a atividade a NOS está diretamente relacionada com processos sinápticos mediados por Glu, pode-se considerar que a marcação de células nNOS-positivas estaria relacionada com a ativação de sinapses glutamatérgicas nesses circuitos. SUAREZ *et al.* (2006) analisaram a distribuição da marcação de GABA, calbindina (CB), calretinina (CR) e nNOS na formação hipocampal e hiperpálcio durante o desenvolvimento e fase adulta de galinhas. No hipocampo observaram ampla distribuição de células CB-positivas que, sendo ligantes de cálcio podem sugerir relação com aumento da marcação nNOS-positiva, principalmente na área dorso-lateral onde foram encontradas mais intensamente. Ainda destacando dados de similaridade, Rosinha (2003), focalizando a marcação de subunidades de receptores de glutamato do tipo AMPA, observou intensa marcação de células GluR1 e GluR2/R3- positivas na área dorsomedial do Hp de pombos.

Ao mesmo tempo, pode-se lembrar que o NO, na via glutamatérgica, se relaciona primordialmente com o receptor NMDA, o que sugere sua participação nos processos de aprendizagem e memória que foram analisados (BREDT e SNYDER, 1994; SUSSWEIN *et al*, 2004). A investigação do papel do NO na aprendizagem e memória foi realizada em muitos estudos com a utilização de inibidores da NOS. Bloqueadores da nNOS interferem diretamente com a liberação de NO em especial, 7-nitroindazole (7-NI) que é seletivo para a isoforma neuronal da NOS. Holscher *et al* (1996) verificaram prejuízo na aprendizagem para navegação espacial no labirinto aquático e o labirinto radial em camundongos tratados com 7-NI antes dos testes. De La Torre e Aliev (2005) sugeriram a importância da participação da enzima NOS em processos de memória espacial, após isquemia cerebral e menor marcação de células nNOS-positivas após administração de 7-NI. Fornel *et al*. (2006) relataram facilitação da habituação da resposta exploratória a sons quando a sessão de treino foi precedida por administração sistêmica de 7-NI. De modo geral, muitos estudos que usaram antagonistas do receptor NMDA para intervir no sistema de transmissão glutamatérgico, seja por administração sistêmica ou por infusões intrahipocâmpais, relataram prejuízos na aprendizagem e memória. Particularmente, com o uso de infusões intrahipocâmpais de antagonistas ou agonistas do receptor NMDA, foi possível averiguar a participação do HpD e do HpV de roedores nesses processos (XU e DAVIS, 1992; ZHANG *et al.* , 1998; GOULD *et al.*, 2002).

Contudo, o papel do NO e da enzima nNOS na aprendizagem e memória ainda não está totalmente esclarecido. Em algumas situações de aprendizagem, o NO tem um papel no estágio inicial da formação da memória de longa duração, mas não após o treinamento. Em contraste em outras situações de aprendizagem o NO participa do processo de consolidação da memória (SUSSWEIN *et al.*, 2004). Os nossos dados

contribuem para o conhecimento dessas relações e sugerem que, em pombos, após o treinamento em 5 sessões de escolha alimentar ocorre uma ativação de maior número de neurônios do HpD que utilizam o NO em comparação com o treinamento inicial.

Na análise das células com imunorreatividade para nNOS no Hp de pombos, tanto após treinamento em escolha alimentar numa única sessão ou durante cinco sessões, foi possível identificar células nNOS-positivas com diferentes características histológicas. Chama a atenção, contudo, o fato de que o número de células nNOS-positivas é proporcionalmente pequeno. Nesse contexto, pode-se perguntar quais seriam as funções desses poucos neurônios nNOS-positivos. Considerando-se a complexidade de mecanismos celulares relacionados com a nNOS, fica claro que esse tipo de questão ainda necessita melhor esclarecimento. Por exemplo, Susswein et al. (2004) ressaltam que embora seja relativamente mais simples do que o de mamíferos e aves o sistema alimentar da *Aplysia* também possui proporcionalmente poucos neurônios que usam NO como agente retrógrado (JACKLET e KOH, 2001). Por outro lado, Katzoff *et al.* (2002) demonstraram que o NO tem um papel crítico na formação de memória após treinamento numa situação relacionada com a busca de alimento na *Aplysia*. Além disso, deve ser ressaltado que nossa análise concentrou-se no Hp, embora uma situação de escolha alimentar num determinado espaço ocorra a ativação de sistemas de comportamento de busca e apreensão de alimentos, cuja função é essencial para as diferentes espécies e é muito complexo em mamíferos e aves. Possivelmente, a investigação da imunorreação para nNOS, não apenas do hipocampo, mas também de outras regiões encefálicas acrescentaria observações interessantes para essa análise. Pode-se afirmar que os mecanismos e processos ativados pela presença do NO nos sistemas neurais envolvidos na aprendizagem e memória da fonte de alimentos ainda necessita de investigações (SUSSWEIN *et al.*, 2004).

Em resumo, os resultados de nosso estudo replicam dados da literatura sobre aprendizagem de escolha alimentar (TOMMASI *et al.*, 1997; WHISHAW, 1998; COLOMBO e BRODBENT, 2001; POUZET *et al.*, 2002). Do mesmo modo, ampliam observações anteriores na medida em que informam sobre a distribuição da imunorreação pa nNOS no hipocampo de pombos e indicam o envolvimento de processos mediados por nNOS nos circuitos hipocampais de pombos que aprenderam a resposta de escolha correta.

6. Conclusões

No seu conjunto, os dados do presente estudo indicam que o treinamento em aprendizagem de localização espacial do alimento atuou como um fator de indução de aumento da imunorreação da enzima nNOS no hipocampo de pombos.

A aprendizagem do comportamento de escolha alimentar foi expressa pela diminuição da latência de escolha entre as tentativas da sessão e entre as sessões de treino. As latências diminuíram significativamente ao longo das cinco sessões de treino enquanto que o número de escolhas corretas aumentou.

A intensidade da imunorreação para nNOS no Hp dos pombos variou em função da duração do treino. A maior ativação da imunorreação para nNOS estaria relacionada com a aprendizagem e memória de longa duração. Como sugerido pelo número significativamente maior de células nNOS-positivas no Hp dos animais EXP5 foi em comparação com os demais grupos.

A imunomarcação para nNOS apresentou um padrão regionalizado, com maior marcação no HpD em comparação com o HpV e no HpVL, em comparação com o HpVM. Essa regionalização da distribuição das células nNOS-positivas no Hp de pombos parece estar relacionada com a organização das conexões hipocámpais intrínsecas as quais se organizam num circuito tri-sináptico, comparável ao encontrado no Hp de mamíferos, conforme descrito por Kahn *et al.* (2003).

Os resultados referentes à indução de maior marcação da nNOS durante o processo de aprendizagem de escolha alimentar acrescentam informações relacionadas com o conhecimento de processos que envolvem regulação da transmissão glutamatérgica via NMDAr, da ativação das enzimas NOS e de mecanismos de sinalização por NO no hipocampo durante processos de aprendizagem espacial.

7. Referências Bibliográficas

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 6023.

AGGLETON, J.P.; HUNT, P.R.; RAWLINS, J.N.P. The effects of hippocampal lesion upon spatial and non-spatial testes of working memory. **Behav Brain Res**, 19:133-146, 1986.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G .Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.** 1; 357(Pt 3):593-615, 2001.

AMARAL-TOMA, M.; FERRARI, E. A. M. Effects of hippocampal lesions in a food location task in pigeons. **Behav Brain Res**, 148:21-34, 2004.

AMARAL-TOMA, M.; Análise dos efeitos de lesões hipocâmpais sobre a aprendizagem e memória espacial de pombos em situação de escolha alimentar. Campinas, 2003,159p. Dissertação (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular, área Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas – UNICAMP.

BAADER, S.L.; SCHILLING, K. Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. **J. Neuros**, 16(4):1440-1449, 1996

BAST, T.; ZHANG, W.N.; FELDON J. Hippocampus and classical fear conditioning. **Hippocampus**.11(6):828-31,2001.

- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F.S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Res Bull.**,69(4):347-55, 2006.
- BERDEAUX, A. Nitric oxide: an ubiquitous messenger. **Fundam Clin Pharmacol**, 7(8):401-411, 1993.
- BINGMAN, V.P.; BAGNOLI, P.; IOALE, P.; CASINI, G. Behavioral and Anatomical Studies of the Avian Hippocampus. **Hippocampus**-379-394, 1989.
- BOND, A.B.; COOK, R.G.; LAMB, M.R. Spatial memory and the performance of rats and pigeons in the radial-arm maze . **Anim Learn Behav**, 9(4):575-580, 1981
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann R Biochem**, 63 (1):175-195, 1994.
- BREDT, D.S.; FERRIS, C., D. SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. **J. Bio Chem.**, 267 (16):10976-10981, 1992.
- BRITO, I.; BRITTO, L.R.; FERRARI, E.A. Classical tone-shock conditioning induces Zenk expression in the pigeon (*Columba livia*) hippocampus.**Behav Neurosci**. 120(2):353-61,2006.
- BRITO, I. Análise da expressão de produto do proto-oncogene ZIF-268 no hipocampo de pombos após o treino em condicionamento clássico aversivo. Campinas, 2002,39p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas – UNICAMP.

BROWN, M.F.; YANG, S.Y.; DIGIAN, K.A. No evidence for overshadowing or facilitation of spatial pattern learning by visual cues. **Anim Learn Behav.** 30(4):363-75, 2002.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.E.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. Artmed Editora, 2^a. Edição, 2002

CAMPBELL, C.B.; HODOS, W. The concept of homology and evolution of nervous system. *B. Beh, Ev.*, 3:353-367, 1970.

CARLSON, N. R. **Physiology of Behavior**. Boston, London, Toronto, Sydney, Tokyo and Singapore: Allyn and Bacon, 2001, 409-450 p.

CASINI, G., BINGMAN, V.P., BAGNOLI, P. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and H-Proline. **Comp Neurol**, 245: 454-470, 1986

CAVE, C.B.; SQUIRE, L.R. Equivalent impairment of spatial and nonspatial memory following damage to the human hippocampus. **Hippocampus**, 3:329-340, 1991.

COLOMBO, M.; BROADBENT N. The role of the avian hippocampus in orientation in space and time. **Brain R. Rev**, 919:292-301, 2001

COLOMBO, M.; BROADBENT N. Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? **Neurosci Biobeh Rev**, 919:292-301, 2000.

COLOMBO, M.; CAWLEY, S.; BROADBENT, N. The effects of hippocampal and area parahippocampal lesion in pigeon: II Concurrent discrimination and spatial learning, **Q J. Exp. Psychol.**, 50 (2):172-189, 1997.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; LONDON, E.D. BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric Oxide Mediates Glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc. Natl Acad**; 88:6368-6371,1993

DE LA TORRE, J.C., ALIEV ,G. Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: spatial memory and immunocytochemical changes. **J. Cereb Blood Flow Metab.** 25(6):663-72, 2005.

EICHENBAUM, H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. **Behav Brain Res**, 127:199-207, 2001

EICHENBAUM, H, OTTO T.;COHEN, N.J. The Hippocampus-What does it do? **Behav Neural Biol** 57:2-36, 1992.

ERICHSEN, J.T.; BINGMAN,V.P., KREBS, J.R. The distribution of neuropeptides in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). **Comp Neurol**, 314: 478-492, 1991.

FERBINTEANU, J.; RAY, C.; MACDONALD, R.J. Both dorsal and ventral hippocampus contribute to spatial learning in Long-Evans rats. **Neurosci Letters** 345:131-135, 2003

FREMOUW, T.; JACKSON-SMITH P.; KESNER, R.P. Impaired place learning and unimpaired cue learning in hippocampal-lesioned pigeons. **Behav Neurosci**; 111(50):963-975, 1997

FINE, I.; JACOBS, R.A. Comparing perceptual learning across tasks: A review. **J Vis** 2:190-203, 2002.

FORNEL, A.C.G.; TEIXEIRA, S.A.; MUSCARÁ, M.; NUCCI, G.; FERRARI, E.A.M. Nitric Oxide synthase and habituation of acoustic exploratory behaviour in pigeons, Pôster 5º Fórum Europeu de Neurociências Vienna, Austria, (2006) .

GASKIN, S.; CHAI, S.C.; WHITE, N.M. Inactivation of the Dorsal Hippocampus does not affect learning during exploration of a novel environment, **Hippocampus** 15:1085-1093, 2005.

GAGLIARDO, A. A lateralized avian hippocampus: preferential role of the left hippocampal formation in homing pigeon sun compass-based spatial learning. **Euro J Neurosci**, 22:2549-2559, 2005

GAGLIARDO, A. Hippocampus and homing in pigeons: left and right hemispheric differences in navigational map learning, **Euro J Neurosci**, 13:1617-1624, 2001.

GASKIN, S.; WHITE, N.M. Cooperation and competition between the dorsal hippocampus and lateral amygdala in spatial discrimination learning. **Hippocampus**; 16(7):577-85, 2006.

GEORGE, D.N.; WARD-ROBINSON, J.; PEARCE, J.M. Discrimination of structure: implications for connectionist theories of discrimination learning. **J Exp Psychol**, 27(3): 206-218, 2001

GOULD, T.J., MCCARTHY, M.M., KEITH, R.A. .MK-801 disrupts acquisition of contextual fear conditioning but enhances memory consolidation of cued fear conditioning. **Behav Pharmacol** 13(4):287-94, 2002.

GOOD, M. ; MACPHAIL, E.M.The Avian Hippocampus and Short-term Memory for Spatial and Non-spatial Information, **Quart J Exp Psych**,47 B(3):293-317,1994

GRAFMAN, J. Conceptualizing functional neuroplasticity. **J Commun Disord**, 33:345-356, 2000

HARTLEY, M.TAYLOR, N.;TAYLOR, J. Subfield variations in hippocampal processing components of a spatial navigation system , **Neur Net** 18:611-619,2005

HAWKINS, R.D.; SON, H.; ARANCIO, O. Nitric Oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. **Proc Brain Res**, 118: 155 – 172, 1998.

IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.; ARDENGHI, P.G.; PEREIRA, P.; RODRIGUES, C. CHOI, H.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. **Behav Brain Res**, 111:93-98, 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, JH.;VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, LA, BARROS, D. Separate mechanisms for short- and long –term memory. **Behav Brain Res**, 103:1-11, 1999

IZQUIERDO, I; MEDINA, J.H. Role of the amygdala,hippocampus and entorhinal córtex in memory consolidation and expression. **Braz J Med Biol Res**, 26:573-589, 1993

KANDEL; E.R.; SCHWARTZ,J.H.; JESSEL,D.M. **Principles of Neural Science** ,N Y McGraw-Hill,2000.

KAHN, M.C.; HOUGH, I.I., G.E.; EYCK G.R.T.; BINGMAN V.P. Internal connectivity of the homing pigeons (*Columba Livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. **J. Comp.Neurol**, 459:127-141, 2003

KARTEN, H.J. e HODOS, W. **A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1967.

KESNER, R.P.; LEE, I. (2003) Differential roles of dorsal hippocampal subregions in spatial working memory with short versus intermediate delay. **Behav Neurosci**, 117(5): 1044-1053, 2003.

KATZOFF ,A., BEN-GEDALYA, T., SUSSWEIN, A.J. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in *aplysia*.. **J Neurosci**. 1; 22(21): 9581-94, 2002

- KOH,H.Y., JACKLET, J.W. Nitric oxide induces cGMP immunoreactivity and modulates membrane conductance in identified central neurons of Aplysia. **Eur J Neurosci.**; 13(3):553-60, 2001
- KRAYNIAK ,P.F.; SIEGEL, A. Efferents connections of the Septal Área in the Pigeons. **Brain Behav. Evol.** 15: 389-404, 1978
- KREBS, J.R.; ERICHSEN, J.T.; BINGMAN, V.P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). **Comp Neurol**, 314: 467-477, 1991.
- KIRCHNER, L., WEITZDOERFER, R., HOEGER, H.; URL A., SCHMIDT, P.; ENGELMANN, M.; VILLAR, S.R.; FOUNTOULAKIS, M.; LUBEC, G.; LUBEC, B. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. **Nitric Oxide**, 11(4): 316-30, 2004.
- KORNEEV, S.A. Timed and targeted differential regulation of nitric oxide synthase (NOS) and anti-NOS genes by reward conditioning leading to long-term memory formation, **J Neurosci**, 25: 1188-1192,2005.
- LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência** , 1ªed , Atheneu, 2003, 698p.
- LEUTGEB, S. Place cells, spatial maps and the population code for memory. **Cur Op Neurobio**, 15: 738-746, 2005.

LI, R.C. Nitric oxide synthase and intermittent hypoxia-induced spatial learning deficits in the rats. **Neurobiol Dis**, 17: 44-53, 2004.

LIU, P; SMITH, P.F.; APPLETON, I.; DARLINGTON, C.L.; BILKEY. Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. **Neurosci**, 119: 679-687, 2003;

MA, L.; LEUNG. S. Metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and nucleus accumbens are involved in generating seizure-induced hippocampal gamma waves and behavioral hyperactivity. **Behav Brain Res**, 133: 45-56, 2002;

MADDEN D.E .The structure and function of glutamate receptor ion channels. **Nat Rev Neurosci**, v 3, p 91- 101, 2002

MAYER, M.L. Glutamate receptor ion channels. **Cur Op Neurobio**, 15: 282-288, 2005.

MAYER, M.L.; ARMSTRONG, N. Structure and Function of Glutamate Receptor ions channels. **Annu.Rev.Physiol**, 66: 161-181, 2004.

MAYER, B. HEMMENS, B Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **T Bioch Scienc**, 22(12): 477-481, 1997.

MISHKIN, M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. **Nature**, 273: 297:8, 1978

MORRIS, R.G.M.; KANDEL, E.R.; SQUIRE, L.R. The neuroscience of learning and memory: cell neural circuits and behavior. **Tins** 11(4): 125-127, 1988.

MORRIS, R.G.M. Spatial Localization does not require the presence of local cues. **Learn Motiv** 12: 239-260, 1981

NADEL, L; .MACDONALD, L Hippocampus: cognitive map or working memory. **Behav Neu Biol**, 29: 405-409, 1980;

NATHAN, C.; XIE, Q. Regulation of Biosynthesis of nitric oxide **J. Bio Chem.**, 269 (19): 13725-13728, 1992.

O'KEEFE, J .E.; NADEL, L – **The hippocampus as a cognitive map**, Oxford, Oxford University Press, 1978.

OLTON, D.S.; WALKER, J.A.; GAGE, F.H. Hippocampal connections and spatial discrimination. **Brain Res**, 139: 295-308, 1978.

PELAGIO, F.C. Participação do óxido nítrico no modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina e sua relação com o efeito da atividade física voluntária sobre memória espacial de camundongos. Campinas, 2006, 117p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas – UNICAMP.

PLECH, A. ;KLIMKIEWICZ, T.; MAKSYM, B. Effect of L-arginine on memory in rats. **Pol J Pharmacol**, 55(6): 987-992, 2003.

POUZET, B.;ZHANG, W.N.,FELDON, J. AND RAWLINS, J.N.P. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies .**Behav Brain Res**,133: 279-291,2002.

PRENDERGAST,M.A., BUCCAFUSCO JJ, TERRY AV JR. Nitric oxide synthase inhibition impairs spatial navigation learning and induces conditioned taste aversion. **Pharmacol Biochem Behav.**; 57(1-2): 347-52, 1997;

PRIOR, H. Orientation and lateralized cue use in pigeons navigating a large indoor environment. **J Exp Biol**, 205: 1795-1805, 2002.

PRIOR, H.; GÜNTÜRKÜN, G. . Parallel working memory for spatial location and food-related object cues in foraging pigeons:binocular and lateralized monocular performance. **Learn Mem**, 8: 44-51, 2001.

RICKARD, N.S.; GIBBS, M.E. Effects of nitric oxide inhibition on avoidance learning in the chick are lateralized and localized. **Neuro Learn Mem**, 79: 252-256, 2003.

ROSINHA, M.U. Distribuição de neuromarcadores na formação hipocampal de aves. 2003. Campinas, 2003,70 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas – UNICAMP.

ROSSIER, J.; HAEBERLI, C. AND SCHENK, F. Auditory cues support place navigation in rats when associated with a visual cue. **Behav Brain Res**, 117: 209-214, 2000.

SHERRY, D.F.; JACOBS, L.F.; GAULIN, S.J.C. Spatial memory and adaptative specialization of the hippocampus, **TINS**, 15(8) : 298-303, 1992.

SKINNER, B.F. **Sobre o Behaviorismo**, 6 ed. SP, CULTRIX, 2000, 216 p.

SPETCH, M.; HONIG, W.K. Characteristics of pigeons spatial working memory in an open-field task. **An Learn Behav**, 16(2), 123-131, 1988;

SPERANDÉO, M.L.A. Evocação da memória contextual aversiva em pombos: efeitos do bloqueio pré-treino do receptor NMDA com o antagonista MK-801 na ativação do produto do proto-ononcogene *zenk* no hipocampo Campinas, 2005, 117p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área Fisiologia). Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas – UNICAMP.

SZÉKELY, AD The Avian hippocampal formation: sub-divisions and connectivity. **Behav Brain Res**, 98 (2): 219-225, 1999.

SUAREZ ,J; DAVILA, J.C.; REAL, M.A.; GUIRADO, S.; MEDINA, L. Calcium-binding proteins, neuronal nitric oxide synthase, and GABA help to distinguish different pallial areas in the developing and adult chicken. I. Hippocampal formation and hyperpallium. **J. Comp Neurol**; 497(5): 751-71, 2006.

SUSSWEIN, A. J., KARTZOFF, A.; MILLER, N. e HURWITZ, I. Nitric oxide and memory, **Neuroscient** 10: 153-162, 2004.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Memória: da Mente às Moléculas, 1ª EDIÇÃO, SP, ARTMED, 2003, 256p

TOMMASI, L.; VALLORTIGARA, G.; ZANFORLIN, M. Young chickens learn to localize the centre of a spatial environment. **J. Comp Physiol A**. 180, 567-572, 1997;

VAN DEN BERGH F., SPRONK, M., FERREIRA, L., BLOEMARTS, E., GROENINK L, OLIVIER B, OOSTING R.. Relationship of delay aversion and response inhibition to extinction learning, aggression, and sexual behaviour. **Behav Brain Res**. 175(1):75-81, 2006.

WATANABE, S. Effects of hippocampal lesions on repeated acquisition of spatial discrimination in pigeons. **Behav. Brain Res.**, v.120, 59-66, 2001.

WATANABE, S.; BISCHOF, H.J. Effects of hippocampus lesions on acquisition and retention of spatial learning in zebra finches. **Behav Brain Res**, 155:147-152, 2004.

WATANABE, S. Effects of partial hippocampal lesions by ibotenic acid on repeated acquisition of spatial discrimination in pigeons. **Rev. Neurosci**, 17(1-2):29-41, 2006.

WEITZDOERFER, R.; HOEGER H.; ENGIDAWORK E.; ENGELMANN, M.; SINGEWALD N.; LUBEC G; .LUBEC, B. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performace. **Nitric Oxide**, 10:130-140, 2004.

WHISHAW, I.Q. Place learning in Hippocampal rats and the path integration hypothesis. **Neurosci Behavi R**, 22 (2):209-220, 1998.

WHITE, A R., STRASSER, R.; BINGMAN, V.P Hippocampus lesions impair landmark array spatial learning in homing pigeons:a laboratory study **Neurobio Learn Mem**,78:65-78,2002.

XAVIER, G.F. Modularidade da Memória e o Sistema Nervoso in **Psicol USP**, S.Paulo 4: 61-115,1993

XU ,X.; DAVIS,R.E. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 impairs learning but not memory fixation or expression of classical fear conditioning in goldfish (*Carassius auratus*). **Behav Neurosci**; 106(2):307-14, 1992.

ZHANG, S.; CHEN, J.WANG, S. Spatial learning and memory induce up-regulation of nitric oxide-producing neurons in rat brain. *Brain Res.* 801:101-6, 1998.

ZOU, L.B.; YAMADA, K.; TANAKA, T.; KAMYANA T.; NABESHIMA, T. Nitric oxide INHIBITORS IMPAIR REFERENCE memory formation in a radial maze task in rats. **Neuropharm**, 37 (3): 323-330, 1998.

APÊNDICE

Tabela 1. Latência de escolha nas tentativas, nas Sessões 1, 2 e 3 de treino dos animais do grupo treinado cinco dias (EXP5)

	ANIMAIS	T1	T2	T3	T4	T5	T6
S1	1709	600	7,19	5,93	19,63	13,07	84,36
	1739	600	600	600	23,84	18,7	249,94
	1858	600	600	46	128,4	130,2	18
	1859	600	600	600	600	134,75	187
	1866	600	600	30	104	152,23	127
	1863	600	600	600	137	132	103,4
	1864	600	600	114	11	39	58
	1865	600	600	600	23,84	18,7	147,87
	MÉDIA	600	525,90	324,49	130,96	79,83	121,95
	DESVIO	0	209,6	296,1	196,6	62,23751	73,64258
S2	E.P.M	0	79,09	111,73	74,18	23,49	27,79
	ANIMAIS	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1709	8	7,79	34,04	3,87	142,16	284,31
	1739	56,43	9,57	13,91	9,27	12,62	5,23
	1858	19	54	21	15	21	99
	1859	600	120	74,5	24	14	140
	1866	90	10	80	59	21	74
	1863	75	10	16	38	22	33
	1864	16	15	15	20	18	22
	1865	600	120	600	24	14	140
S3	MÉDIA	183,05	43,30	106,81	24,14	33,10	99,69
	DESVIO	258,99	49,71	201,06	17,48	44,22	90,55
	E.P.M	97,73	18,76	75,87	6,60	16,69	34,17
	ANIMAIS	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1709	21,59	41,71	27,19	245,5	11,96	95,66
	1739	23,03	10,68	4,7	13,41	27,87	33,73
	1858	178	4	24	5	13	11
	1859	25	32	13	13	15	79
	1866	31	600	15	106	54,13	64,5
	1863	27	10	10	24	12	17
	1864	7	11	9	6	48	18
	1865	90	10	80	59	21	74
	MÉDIA	50,33	89,92	22,86	58,99	25,37	49,11
	DESVIO	57,17	206,51	24,29	82,93	16,83	32,96
	E.P.M	21,57	77,93	9,17	31,30	6,35	12,44

Tabela 2. Latência nas tentativas para nas Sessões 4 e 5 de treino dos animais Experimentais 5 dias (EXP5)

S4	ANIMAIS	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1709	247,2	12,5	232,9	245,5	5,26	284,31
	1739	10,59	18,31	4,2	8,93	14,69	249,94
	1858	12	12	15	9	4	15
	1859	12	274,8	173	100	12	99
	1866	29	15	119	74	62	40
	1863	40	32	22	16	19	10
	1864	7	9	8	14	9	18
	1865	18,43	12,5	51	37,4	5,26	38,5
	MÉDIA	47,03	48,26	78,13	63,11	16,40	94,34
	DESVIO	81,63	91,81	86,91	80,99	19,14	110,60
	E.P.M	30,80	34,64	32,79	30,56	7,22	41,74
S5	ANIMAIS	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	1709	6,52	9,61	6,89	4,13	80,49	41,54
	1739	17,14	17,13	38,34	15,19	11,92	10,73
	1858	12	13	130,2	13	13	16
	1859	38	22	63	29	32,75	17
	1866	74	9	9	33	84	17
	1863	15	8	10	7	7	5
	1864	10	13	7	10	12	7
	1865	6,52	9,61	6,89	4,13	80,49	41,54
	MÉDIA	22,40	12,67	33,92	14,43	40,21	19,48
	DESVIO	23,16	4,80	43,94	11,00	35,17	14,34
	E.P.M	8,74	1,81	16,58	4,15	13,27	5,41

Tabela 3. Latência nas seis tentativas para a única sessão de treino do grupo Experimental 1 dia (EXP1)

ANIMAIS	T1	T2	T3	T4	T5	T6
1786	600	600	8	62	14,32	34,32
1787	600	73	64,42	600	60,55	13,76
1847	600	600	600	25,08	9,78	5,17
1848	490,06	318	41,7	79,93	59	18,03
1851	118	87	70	68	58	35
1862	535	230	180	85	63	45
1861	490,06	318	160,69	153,33	47,78	25,21
MÉDIA	490,45	318	160,69	153,33	44,63	25,21
DESVIO	158,8834	200,0636	188,3506	185,796	21,10957	12,84377
E.P.M	145,7	140,7	114,7	112,1	12,55	5,29

Tabela 4. Latências comparadas nas seis tentativas da primeira sessão de treino do grupos grupos Experimental 1 dia (EXP1) e Experimental 5 dias (EXP5)

SESSÃO ÚNICA EXPERIMENTAL 1 DIA						
S1	T1	T2	T3	T4	T5	T6
MÉDIA	490,45	318,00	160,69	153,33	44,63	25,21
DESVIO	158,88	200,06	188,35	185,80	21,11	12,84
E.P.M	145,70	140,70	114,70	112,10	12,55	5,29
SESSÃO 1 EXPERIMENTAL 5 DIAS						
S1	T1	T2	T3	T4	T5	T6
MÉDIA	600	525,90	324,49	130,96	79,83	121,95
DESVIO	0	209,59	296,0913	196,5788	62,23751	73,64258
E.P.M	0	79,09	111,73	74,18	23,49	27,79

Tabela 5. Contagem geral para células nNOS-positivas para Hipocampo Dorsal (HpD),Ventro-Lateral (HpVL),Ventro-Medial (HpVM) para os grupos Manipulação (Man),Controle 1 dia (Cont1),Experimental 1 dia (Exp1),Controle 5 dias (Cont5) e Experimental 5 dias (Exp5)

GRUPOS	REGIÕES/N1				REGIÕES /N2				REGIÕES/N3				TOTAL
	HpD	HpVL	HpVM	Média	HpD	HpVL	HpVM	Média	HpD	HpVL	HpVM	Média	Md
MAN													
1984	2,64	1,15	0,80	1,53	1,59	0,58	0,58	0,92	0,75	0,50	0,25	0,50	0,98
1889	2,41	1,11	0,69	1,40	2,33	1,00	0,67	1,33	0,67	0,33	0,33	0,44	1,06
2053	2,87	1,88	1,02	1,92	3,60	2,00	1,60	2,40	2,81	1,76	1,62	2,06	2,13
2020	3,14	2,20	1,26	2,20	3,20	2,40	1,40	2,33	2,75	2,00	2,00	2,25	2,26
2021	3,31	2,27	1,34	2,31	3,18	2,12	1,28	2,19	3,00	2,50	1,83	2,44	2,31
3030	4,71	2,53	2,00	3,08	3,75	2,63	3,88	3,42	3,90	3,50	2,10	3,17	3,22
Med	3,18	1,86	1,18	2,07	2,94	1,79	1,57	2,10	2,31	1,77	1,36	1,81	1,99
d.p	0,75	0,55	0,43	0,61	0,75	0,74	1,10	0,88	1,20	1,10	0,77	1,10	0,85
e.p.m	0,33	0,24	0,19	0,27	0,34	0,33	0,49	0,39	0,53	0,49	0,34	0,49	0,38
CONT1													
1852	4	3	2,4	3,13	2,6	3,2	4,6	3,47	3,4	2,4	2	2,60	3,07
1785	2	0,71	0,71	1,14	1,6	0,8	0,6	1,00	2,6	1	1,4	1,67	1,27
1789	1,67	1,17	1,67	1,50	1	3	3,5	2,50	1,25	0,25	0	0,50	1,50
1850	1,67	1,00	0,67	1,11	1,6	2,6	1,6	1,93	1	1,75	1	1,25	1,43
1849	2	0,6	0,8	1,13	2,75	1,25	0,75	1,58	1,2	1,4	1	1,20	1,31
2022	2,2	1	0,6	1,27	2	1,25	0,5	1,25	1,5	0,5	0,5	0,83	1,12
Med	2,26	1,25	1,14	1,55	1,93	2,02	1,93	1,96	1,83	1,22	0,98	1,34	1,62
d.p	0,80	0,81	0,67	0,79	0,61	0,95	1,58	0,91	0,87	0,73	0,63	0,73	0,72
e.p.m	0,36	0,36	0,30	0,35	0,27	0,42	0,70	0,41	0,39	0,33	0,28	0,33	0,32
EXP1													
1786	3,67	1,17	0,67	1,83	2,80	3,60	2,40	2,93	4,20	2,80	2,20	3,07	2,61
1851	3,50	1,50	1,00	2,00	2,67	1,67	1,33	1,89	2,00	1,00	0,50	1,17	1,69
1848	3,25	1,75	0,25	1,75	1,67	2,17	1,17	1,67	1,71	2,57	1,29	1,86	1,76
1861	3,20	2,00	1,00	2,07	3,22	2,00	1,56	2,26	2,25	1,50	1,25	1,67	2,00
1862	3,20	2,00	1,00	2,07	2,33	1,17	0,67	1,39	1,00	1,50	0,50	1,00	1,49
Med	3,36	1,68	0,78	1,94	2,54	2,12	1,42	2,03	2,23	1,87	1,15	1,75	1,91
d.p	0,19	0,32	0,30	0,14	0,52	0,82	0,57	0,60	1,07	0,69	0,63	0,81	0,43
e.p.m	0,09	0,16	0,15	0,07	0,26	0,41	0,28	0,30	0,53	0,35	0,31	0,41	0,22
CONT5													
1857	3,78	2,22	0,89	2,30	4,00	2,29	1,29	2,52	3,80	1,80	0,60	2,07	2,30
1887	2,25	2,00	1,00	1,75	3,50	2,00	0,83	2,11	2,50	3,25	2,00	2,58	2,15
1860	5,25	3,25	3,00	3,83	4,00	1,50	1,50	2,33	3,00	1,33	1,67	2,00	2,72
1890	4,17	1,83	1,83	2,61	2,60	1,40	1,80	1,93	1,40	0,00	0,60	0,67	1,74
1867	2,60	2,20	1,80	2,20	2,00	1,63	1,25	1,63	2,00	0,50	1,75	1,42	1,75
Med	3,20	2,06	1,38	2,21	3,03	1,83	1,29	2,05	2,43	1,39	1,24	1,68	1,98
d.p	1,10	0,50	0,77	0,79	0,80	0,33	0,32	0,35	0,82	1,13	0,60	0,73	0,41
e.p.m	0,55	0,25	0,38	0,39	0,40	0,17	0,16	0,17	0,41	0,56	0,30	0,37	0,21
EXP5													
1859	6,88	2,75	2,50	4,04	6,71	3,43	1,71	3,95	8,50	1,75	1,25	3,83	3,94
1858	11,40	3,40	3,00	5,93	9,67	2,33	1,00	4,33	5,00	2,00	1,33	2,78	4,35
1863	6,00	3,00	2,67	3,89	4,00	1,25	1,00	2,08	3,44	2,00	2,11	2,52	2,83
1864	8,38	2,13	1,44	3,98	5,22	1,67	1,33	2,74	5,00	2,00	1,60	2,87	3,20
1865	7,50	2,40	2,00	3,97	5,50	2,40	2,50	3,47	3,71	1,71	1,86	2,43	3,29
Med	8,03	2,74	2,32	4,36	6,22	2,22	1,51	3,32	5,13	1,89	1,63	2,88	3,52
d.p	1,86	0,45	0,55	0,88	1,93	0,74	0,56	0,91	1,80	0,13	0,32	0,56	0,61
e.p.m	0,93	0,22	0,27	0,44	0,96	0,37	0,28	0,46	0,90	0,07	0,16	0,28	0,31

Tabela 6. Contagem geral para células nNOS-positivas para Hipocampo Dorsal (HpD) para os grupos Manipulação (Man),Controle 1 dia (Cont1),Experimental 1 dia (Exp1),Controle 5 dias (Cont5) e Experimental 5 dias (Exp5)

MAN	HpD N1	HpD N2	HpD N3	MÉDIA GERAL
1984	2,64	1,59	0,75	1,66
1889	2,41	2,33	0,67	1,80
2053	2,87	3,60	2,81	3,09
2020	3,14	3,20	2,75	3,03
2021	3,31	3,18	3,00	3,16
3030	4,71	3,75	3,90	4,12
MÉDIA	3,18	2,94	2,31	2,81
Desvio	0,75	0,75	1,20	0,93
e.p.m	0,33	0,34	0,53	0,41
CONT1	HpD N1	HpD N2	HpD N3	MÉDIA GERAL
1852	4	2,6	3,40	3,33
1785	2	1,60	2,60	2,07
1789	1,67	1,00	1,25	1,31
1850	1,67	1,60	1,00	1,42
1849	2	2,75	1,20	1,98
2022	2,2	2	1,50	1,90
MÉDIA	2,26	1,93	1,83	2,00
Desvio	0,80	0,61	0,87452368	0,72
e.p.m	0,36	0,27	0,39	0,32
EXP1	HpD N1	HpD N2	HpD N3	MÉDIA GERAL
1786	3,67	2,80	4,20	3,56
1851	3,50	2,67	2,00	2,72
1848	3,25	1,67	1,71	2,21
1861	3,20	3,22	2,25	2,89
1862	3,20	2,33	1,00	2,18
MÉDIA	3,36	2,54	2,23	2,71
Desvio	0,19	0,52	1,07	0,57
e.p.m	0,09	0,26	0,53	0,28
CONT5	HpD N1	HpD N2	HpD N3	MÉDIA GERAL
1857	3,78	4,00	3,80	3,86
1887	2,25	3,50	2,50	2,75
1860	5,25	4,00	3,00	4,08
1890	4,17	2,60	1,40	2,72
1867	2,60	2,00	2,00	2,20
MÉDIA	3,20	3,03	2,43	3,12
Desvio	1,10	0,80	0,82	0,81
e.p.m	0,55	0,40	0,41	0,40
EXP5	HpD N1	HpD N2	HpD N3	MÉDIA GERAL
1859	6,88	6,71	8,50	7,36
1858	11,40	9,67	5,00	8,69
1863	6,00	4,00	3,44	4,48
1864	8,38	5,22	5,00	6,20
1865	7,50	5,50	3,71	5,57
MÉDIA	8,03	6,22	5,13	6,46
Desvio	1,86	1,93	1,80	1,62
e.p.m	0,93	0,96	0,90	0,81

Tabela 7. Contagem geral para células nNOS-positivas para Hipocampo Ventral (HpV) para os grupos Manipulação (Man), Controle 1 dia (Cont1), Experimental 1 dia (Exp1), Controle 5 dias (Cont5) e Experimental 5 dias (Exp5)

GRUPO			N1			N2			N3	TOTAL
MAN	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	Med
1984	1,15	0,80	1	0,58	0,58	0,58	0,50	0,25	0,38	0,64
1889	1,11	0,69	1	1,00	0,67	0,83	0,33	0,33	0,33	0,69
2053	1,88	1,02	1	2,00	1,60	1,80	1,76	1,62	1,69	1,65
2020	2,20	1,26	2	2,40	1,40	1,90	2,00	2,00	2,00	1,88
2021	2,27	1,34	2	2,12	1,28	1,70	2,50	1,83	2,17	1,89
3030	2,53	2,00	2	2,63	3,88	3,25	3,50	2,10	2,80	2,77
MÉDIA	1,86	1,18	2	1,79	1,57	1,68	1,77	1,36	1,56	1,59
desvio	0,55	0,43	0,52	0,81	1,20	0,94	1,20	0,84	1,00	0,81
e.p.m	0,24	0,19	0,23	0,36	0,54	0,42	0,54	0,38	0,45	0,36
CONT1	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	Med
1852	3	2,4	2,70	3,20	4,60	3,90	2,40	2,00	2,20	2,93
1785	0,71	0,71	0,71	0,80	0,60	0,70	1,00	1,40	1,20	0,87
1789	1,17	1,67	1,42	3,00	3,50	3,25	0,25	0,00	0,13	1,60
1850	1,00	0,67	0,83	2,60	1,60	2,10	1,75	1,00	1,38	1,44
1849	0,6	0,8	0,70	1,25	0,75	1,00	1,40	1,00	1,20	0,97
2022	1	0,6	0,80	1,25	0,50	0,88	0,50	0,50	0,50	0,73
MÉDIA	1,25	1,14	1,19	2,02	1,93	1,97	1,22	0,98	1,10	1,42
desvio	0,81	0,67	0,78	1,04	1,73	1,35	0,80	0,69	0,72	0,81
e.p.m	0,36	0,30	0,35	0,46	0,77	0,60	0,36	0,31	0,32	0,36
EXP1	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	Med
1786	1,17	0,67	0,92	3,60	2,40	3,00	2,80	2,20	2,50	2,14
1851	1,50	1,00	1,25	1,67	1,33	1,50	1,00	0,50	0,75	1,17
1848	1,75	0,25	1,00	2,17	1,17	1,67	2,57	1,29	1,93	1,53
1861	2,00	1,00	1,50	2,00	1,56	1,78	1,50	1,25	1,38	1,55
1862	2,00	1,00	1,50	1,17	0,67	0,92	1,50	0,50	1,00	1,14
MÉDIA	1,68	0,78	1,23	2,12	1,42	1,77	1,87	1,15	1,51	1,51
desvio	0,32	0,30	0,27	0,91	0,64	0,76	0,77	0,70	0,71	0,40
e.p.m	0,16	0,15	0,14	0,46	0,32	0,38	0,39	0,35	0,35	0,20
CONT5	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	Med
1857	2,22	0,89	1,56	2,29	1,29	1,79	1,80	0,60	1,20	1,51
1887	2,00	1,00	1,50	2,00	0,83	1,42	3,25	2,00	2,63	1,85
1860	3,25	3,00	3,13	1,50	1,50	1,50	1,33	1,67	1,50	2,04
1890	1,83	1,83	1,83	1,40	1,80	1,60	0,00	0,60	0,30	1,24
1867	2,20	1,80	2,00	1,63	1,25	1,44	0,50	1,75	1,13	1,52
MÉDIA	2,06	1,38	1,72	1,83	1,29	1,56	1,39	1,24	1,31	1,47
desvio	0,50	0,77	0,66	0,37	0,36	0,15	1,26	0,67	0,84	0,31
e.p.m	0,25	0,38	0,33	0,19	0,18	0,08	0,63	0,34	0,42	0,16
EXP5	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	HpVL	HpVM	MÉDIA	Med
1859	2,75	2,50	2,63	3,43	1,71	2,57	1,75	1,25	1,50	2,23
1858	3,40	3,00	3,20	2,33	1,00	1,67	2,00	1,33	1,67	2,18
1863	3,00	2,67	2,83	1,25	1,00	1,13	2,00	2,11	2,06	2,00
1864	2,13	1,44	1,78	1,67	1,33	1,50	2,00	1,60	1,80	1,69
1865	2,40	2,00	2,20	2,40	2,50	2,45	1,71	1,86	1,79	2,15
MÉDIA	2,74	2,32	2,53	2,22	1,51	1,86	1,89	1,63	1,76	2,05
desvio	0,45	0,55	0,55	0,83	0,63	0,62	0,15	0,36	0,20	0,22
e.p.m	0,22	0,27	0,28	0,41	0,31	0,31	0,07	0,18	0,10	0,11

Tabela 8. Contagem geral para células nNOS-positivas para Hipocampo Ventro-Lateral (HpVL) e Hipocampo Ventro-Medial (HpVM) para os grupos Manipulação (Man), Controle 1 dia (Cont1), Experimental 1 dia (Exp1), Controle 5 dias (Cont5) e Experimental 5 dias (Exp5)

GRUPOS	Hp Ventro-Lateral				Hp Ventro-Medial			
MAN	N1	N2	N3	MÉDIA	N1	N2	N3	MÉDIA
1984	1,15	0,58	0,50	0,74	0,80	0,58	0,25	0,54
1889	1,11	1,00	0,33	0,82	0,69	0,67	0,33	0,56
2053	1,88	2,00	1,76	1,88	1,02	1,60	1,62	1,41
2020	2,20	2,40	2,00	2,20	1,26	1,40	2,00	1,55
2021	2,27	2,12	2,50	2,30	1,34	1,28	1,83	1,48
3030	2,53	2,63	3,50	2,88	2,00	3,88	2,10	2,66
MÉDIA	1,86	1,79	1,77	1,80	1,18	1,57	1,36	1,37
desvio	0,60	0,81	1,20	0,86	0,47	1,20	0,84	0,78
e.p.m	0,27	0,36	0,54	0,38	0,21	0,54	0,38	0,35
CONT1	N1	N2	N3	MÉDIA	N1	N2	N3	MÉDIA
1852	3	3,20	2,40	2,87	2,4	4,60	2,00	3
1785	0,71	0,80	1,00	0,84	0,71	0,60	1,40	0,90
1789	1,17	3,00	0,25	1,47	1,67	3,50	0,00	1,72
1850	1,00	2,60	1,75	1,78	0,67	1,60	1,00	1,09
1849	0,6	1,25	1,40	1,08	0,8	0,75	1,00	0,85
2022	1	1,25	0,50	0,92	0,6	0,50	0,50	0,53
MÉDIA	1,25	2,02	1,22	1,49	1,14	1,93	0,98	1,35
desvio	0,88	1,04	0,80	0,76	0,73	1,73	0,69	0,90
e.p.m	0,39	0,46	0,36	0,34	0,33	0,77	0,31	0,40
EXP1	N1	N2	N3	MÉDIA	N1	N2	N3	MÉDIA
1786	1,17	3,60	2,80	2,52	0,67	2,40	2,20	1,76
1851	1,50	1,67	1,00	1,39	1,00	1,33	0,50	0,94
1848	1,75	2,17	2,57	2,16	0,25	1,17	1,29	0,90
1861	2,00	2,00	1,50	1,83	1,00	1,56	1,25	1,27
1862	2,00	1,17	1,50	1,56	1,00	0,67	0,50	0,72
MÉDIA	1,68	2,12	1,87	1,89	0,78	1,42	1,15	1,12
desvio	0,36	0,91	0,77	0,46	0,33	0,64	0,70	0,41
e.p.m	0,18	0,46	0,39	0,23	0,17	0,32	0,35	0,20
CONT5	N1	N2	N3	MÉDIA	N1	N2	N3	MÉDIA
1857	2,22	2,29	1,80	2,10	0,89	1,29	0,60	0,92
1887	2,00	2,00	3,25	2,42	1,00	0,83	2,00	1,28
1860	3,25	1,50	1,33	2,03	3,00	1,50	1,67	2,06
1890	1,83	1,40	0,00	1,08	1,83	1,80	0,60	1,41
1867	2,20	1,63	0,50	1,44	1,80	1,25	1,75	1,60
MÉDIA	2,06	1,83	1,39	1,81	1,38	1,29	1,24	1,45
desvio	0,50	0,37	1,26	0,54	0,85	0,36	0,67	0,42
e.p.m	0,25	0,19	0,63	0,27	0,42	0,18	0,34	0,21
EXP5	N1	N2	N3	MÉDIA	N1	N2	N3	MÉDIA
1859	2,75	3,43	1,75	2,64	2,50	1,71	1,25	1,82
1858	3,40	2,33	2,00	2,58	3,00	1,00	1,33	1,78
1863	3,00	1,25	2,00	2,08	2,67	1,00	2,11	1,93
1864	2,13	1,67	2,00	1,93	1,44	1,33	1,60	1,46
1865	2,40	2,40	1,71	2,17	2,00	2,50	1,86	2,12
MÉDIA	2,74	2,22	1,89	2,28	2,32	1,51	1,63	1,82
desvio	0,45	0,83	0,15	0,31	0,61	0,63	0,36	0,24
e.p.m	0,22	0,41	0,07	0,16	0,31	0,31	0,18	0,12

Tabela 9. Contagem geral para células nNOS-positivas para Hipocampo Dorsal (HpD) e Hipocampo Ventral (HpV) para os grupos Manipulação (Man), Controle 1 dia (Cont1), Experimental 1 dia (Exp1), Controle 5 dias (Cont5) e Experimental 5 dias (Exp5)

GRUPOS	HPD	HPV
MAN	MÉDIA GERAL	MÉDIA GERAL
1984	1,66	0,64
1889	1,80	0,69
2053	3,09	1,65
2020	3,03	1,88
2021	3,16	1,89
3030	4,12	2,77
MÉDIA	2,81	1,59
desvio	0,93	0,81
e.p.m	0,42	0,36
CONT1	MÉDIA GERAL	MÉDIA GERAL
1852	3,33	2,93
1785	2,07	0,87
1789	1,31	1,60
1850	1,42	1,44
1849	1,98	0,97
2022	1,90	0,73
MÉDIA	2,00	1,42
desvio	0,72	0,81
e.p.m	0,32	0,36
EXP1	MÉDIA GERAL	MÉDIA GERAL
1786	3,56	2,14
1851	2,72	1,17
1848	2,21	1,53
1861	2,89	1,55
1862	2,18	1,14
MÉDIA	2,71	1,51
desvio	0,57	0,40
e.p.m	0,29	0,2
CONT5	MÉDIA GERAL	MÉDIA GERAL
1857	3,86	1,51
1887	2,75	1,85
1860	4,08	2,04
1890	2,72	1,24
1867	2,20	1,52
MÉDIA	3,12	1,47
desvio	0,81	0,31
e.p.m	0,41	0,16
EXP5	MÉDIA GERAL	MÉDIA GERAL
1859	7,36	2,23
1858	8,69	2,18
1863	4,48	2,00
1864	6,20	1,69
1865	5,57	2,15
MÉDIA	6,46	2,05
desvio	1,62	0,22
e.p.m	0,81	0,11